

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



DBS – “*Dried Blood Spots*”: estudo sobre a sua aplicação na área da  
Toxicologia Forense

Susana Maria dos Santos Sadler Simões

Orientador: Mestre Mário João Dias  
Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Coorientador: Professor Doutor Jorge Costa Santos  
Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre em  
Medicina Legal e Ciências Forenses

Lisboa, 2016



Todas as afirmações efetuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa em reunião de 19 de Abril de 2016.



## AGRADECIMENTOS

*Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao Mestre Mário João Dias, por ser meu orientador e amigo não só durante o trabalho desenvolvido nesta tese, mas sobretudo durante todo o meu percurso a trabalhar no Serviço de Química e Toxicologia Forenses. O seu apoio constante e confiança em mim tornaram este desafio mais fácil de ultrapassar.*

*Ao Professor Doutor Jorge Costa Santos por ter aceitado ser coorientador desta tese, e pelo apoio à realização deste trabalho.*

*Ao Mestre João Miguel Franco, pelo seu apoio e incentivo como diretor do Serviço de Química e Toxicologia Forenses, na realização deste trabalho.*

*A todos os colegas do Serviço de Química e Toxicologia Forenses pela paciência demonstrada pelos inconvenientes causados na rotina do laboratório durante a parte prática deste trabalho. Um agradecimento especial à Suzana Fonseca, colega de trabalho e de mestrado, pela companhia nas longas manhãs e tardes passadas no anfiteatro, e pela paciência, amizade e companheirismo demonstrado durante todo o percurso.*

*Um agradecimento muito especial a toda a minha família. Ao meu pai por estar sempre presente e pronto a ajudar. À minha irmã pelo seu imenso carinho e coragem. E em especial à minha mãe e melhor amiga, uma presença e ajuda constante, sem a qual não poderia chegar até aqui. Ao Antonio, companheiro de vida e de trabalho, pela paciência em suportar o meu “lado lunar”, por ouvir os meus desabafos, pelos seus conselhos, apoio e confiança. E não podia deixar de agradecer aos meus filhos, Tiago e Teresa, por serem como são... por me tornarem a vida tão fácil e às vezes tão difícil... quero-vos muito.*

# ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	i
ÍNDICE GERAL.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
SÍMBOLOS, UNIDADES E ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Dried Blood Spots</i> .....	3
1.1.1. Colheita das amostras, armazenamento e transporte das <i>DBS</i> .....	3
1.1.2. Procedimentos de extração das amostras <i>DBS</i> .....	8
1.1.3. Limitações da técnica de <i>DBS</i> e características com impacto numa análise quantitativa.....	13
1.2. Técnicas instrumentais utilizadas na análise das <i>DBS</i> .....	22
1.2.1. Cromatografia líquida de ultra performance ( <i>UPLC</i> ).....	25
1.2.2. Interface ( <i>ESI – Electrospray Ionization</i> ).....	27
1.2.3. Espéctrometro de massa/massa – Triplo quadrupolo ( <i>TQD</i> ).....	29
1.3. Aplicações das <i>DBS</i> na área da Toxicologia Forense.....	33
1.4. Drogas de abuso.....	38
1.4.1. Anfetaminas.....	40
1.4.2. Cocaína.....	44
1.4.3. Opiáceos.....	47
1.4.4. Metadona.....	51

---

1.5. Revisão bibliográfica da análise das drogas de abuso pela técnica de <i>DBS</i> .....	52
1.6. Validação de métodos analíticos envolvendo a técnica de <i>DBS</i> .....	59
<b>2. OBJETIVOS DO ESTUDO.....</b>	<b>65</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
3.1. Padrões e reagentes.....	66
3.2. Soluções.....	66
3.3. Equipamentos.....	68
3.4. Materiais.....	69
3.5. Amostras biológicas.....	70
3.6. Procedimento experimental.....	70
3.6.1. Condições instrumentais.....	70
3.6.2. Preparação das manchas de sangue seco ( <i>DBS</i> ).....	73
3.6.3. Extração dos analitos das <i>DBS</i> .....	73
3.7. Procedimento de validação.....	74
3.7.1. Seletividade.....	74
3.7.2. Eficiência da extração.....	77
3.7.3. Arrastamento.....	78
3.7.4. Efeito de matriz.....	79
3.7.5. Limite de detecção e de quantificação.....	80
3.7.6. Linearidade/Modelo de calibração.....	82
3.7.7. Repetibilidade e Precisão intermédia.....	85
3.7.8. Exatidão.....	87
3.7.9. Robustez.....	89
3.7.10. Integridade da diluição.....	89

3.7.11. Estudo da estabilidade.....	90
3.8. Análise de amostras reais/Comparação com métodos validados em sangue total....	92
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>95</b>
4.1. Condições instrumentais de análise.....	95
4.2. Procedimento de preparação das amostras.....	96
4.3. Validação.....	100
4.3.1. Seletividade.....	101
4.3.2. Eficiência da extração.....	108
4.3.3. Arrastamento.....	110
4.3.4. Efeito de matriz.....	110
4.3.5. Limite de detecção e de quantificação.....	112
4.3.6. Linearidade/Modelo de calibração.....	116
4.3.7. Repetibilidade, Precisão intermédia e Exatidão.....	118
4.3.8. Robustez.....	120
4.3.9. Integridade da diluição.....	121
4.3.10. Estudo da estabilidade.....	122
4.4. Análise de amostras reais/Comparação com métodos validados em sangue total..	133
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>138</b>
<b>6. PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>142</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>143</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>156</b>
8.1. Anexo A – Resultados obtidos no estudo do LD e LQ para cada uma das substâncias .....	156



8.2. Anexo B – Resultados obtidos para o estudo da linearidade e seleção do modelo de calibração.....	162
8.3. Anexo C – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade.....	168
8.4. Anexo D – Resultados obtidos para o estudo da precisão intermédia.....	174
8.5. Anexo E – Resultados obtidos para o estudo da exatidão.....	185
8.6. Anexo F – Resultados obtidos para a análise das amostras reais.....	189
8.7. Anexo G – Teste- $t$ para dados emparelhados.....	191

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Técnicas de amostragem utilizadas nas <i>DBS</i> : (a) aplicação do sangue diretamente do dedo ou calcanhar para o papel de filtro; (b) recolha do sangue e aplicação no papel de filtro recorrendo a um capilar de precisão; (c) aplicação no papel de filtro de um volume exato de sangue venoso com recurso a uma micropipeta.....	3
<b>Figura 2</b> – Exemplos de tipos de cartões utilizados nas <i>DBS</i> (Whatman ® 903; Whatman® BFC 180; Whatman® FTA DMPK-A, B, ou C e o FTA Elute; Bond Elut DMS).....	6
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática de um sistema <i>UPLC-MS/MS</i> (triplo quadrupolo)..	24
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática do processo de ionização por <i>Electrospray (ESI)</i> ....	29
<b>Figura 5</b> – Representação esquemática do funcionamento de um quadrupolo.....	31
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática de um analisador triplo quadrupolo no modo <i>MRM</i> . .....	32
<b>Figura 7</b> – Principais vias metabólicas da metanfetamina e da anfetamina.....	42
<b>Figura 8</b> – Principais vias metabólicas do MDMA.....	44
<b>Figura 9</b> – Principais vias metabólicas da cocaína.....	46
<b>Figura 10</b> – Principais vias metabólicas da morfina, codeína e heroína.....	49
<b>Figura 11</b> – Principal via metabólica da metadona.....	52

<b>Figura 12a</b> – Exemplo dos cromatogramas obtidos no estudo da seletividade para uma amostra branca.....	102
<b>Figura 12b</b> – Exemplo dos cromatogramas obtidos no estudo da seletividade para uma amostra fortificada com as drogas de abuso (10 ng/mL).....	103
<b>Figura 12c</b> – Exemplo dos cromatogramas obtidos no estudo da seletividade para uma amostra de sangue branco para as drogas de abuso, fortificada com 24 substâncias medicamentosas.....	103
<b>Figura 13a</b> – Representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos para as amostras e os controlos positivos para as três temperaturas de armazenamento (T.amb; 2 – 8°C e -10°C) para a morfina, codeína e 6-monoacetilmorfina.....	123
<b>Figura 13b</b> – Representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos para as amostras e os controlos positivos para as três temperaturas de armazenamento (T.amb; 2 – 8°C e -10°C) para a anfetamina, o MDA e a metanfetamina.....	124
<b>Figura 13c</b> – Representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos para as amostras e os controlos positivos para as três temperaturas de armazenamento (T.amb; 2 – 8°C e -10°C) para o MDMA, a benzoilecgonina e a cocaína.....	125
<b>Figura 13d</b> – Representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos para as amostras e os controlos positivos para as três temperaturas de armazenamento (T.amb; 2 – 8°C e -10°C) para o EDDP e a metadona.....	126
<b>Figura 14</b> – Representação gráfica da análise da regressão linear entre os dados adquiridos a partir dos métodos de referência <i>versus</i> os resultados obtidos através do método em estudo (a	

linha a tracejado representa a igualdade entre resultados; a linha contínua corresponde ao resultado da regressão linear cuja equação e coeficiente de correlação encontram-se na figura)

..... 134

**Figura 15** – Análise de Bland-Altman – Representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos a partir do método em sangue total (ST) e do método das *DBS versus* a média dos dois valores (onde, a linha contínua corresponde à diferença percentual média (-6,2%) e as linhas a tracejado representam os limites de concordância de 95% (-53% e 40%)).

..... 136

**Figura 16** – Representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos a partir do método em sangue total (ST) e do método das *DBS versus* a média dos dois valores (onde, a linha contínua corresponde à diferença percentual média (-6,2%) e as linhas a tracejado representam os limites fixos de  $\pm 20\%$ ..... 137

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Revisão bibliográfica da análise de drogas de abuso pela técnica de <i>DBS</i> ...	54 - 57
<b>Tabela 2</b> – Gradiente utilizado na separação cromatográfica.....	71
<b>Tabela 3</b> – Transições <i>MRM</i> , voltagem de cone, energia de colisão e tempo de retenção (TR) para os analitos e PIs.....	72
<b>Tabela 4</b> – Intervalo de tolerância para as áreas relativas dos iões diagnóstico.....	76
<b>Tabela 5</b> – Tabela ANOVA (fator único).....	86
<b>Tabela 6</b> – Cálculo da estimativa da precisão intermédia.....	87
<b>Tabela 7</b> – Estudo da seletividade para as amostras fortificadas com as drogas de abuso.....	104 - 107
<b>Tabela 8</b> – Recuperação média (%) da fase de extração para cada uma das substâncias em estudo para dois níveis de concentração (20 ng/mL e 200 ng/mL).....	108
<b>Tabela 9</b> – Efeito de matriz em função do valor de concentração.....	111
<b>Tabela 10</b> – Efeito de matriz em função de dez matrizes diferentes.....	112
<b>Tabela 11</b> – Resultados obtidos para o LD e LQ .....	113
<b>Tabela 12</b> – Estudo da linearidade e modelo de calibração (melhor fator de ponderação, somatório dos erros relativos percentuais ( $\sum ER\%$ ) e média do coeficiente de correlação ( $r^2$ )).	117

<b>Tabela 13</b> – Estudo da repetibilidade (CV%), precisão intermédia (CV% ) e exatidão ( <i>Bias</i> )...	119
<b>Tabela 14</b> – Estudo da integridade da diluição.....	121
<b>Tabela 15</b> – Diferença percentual entre as amostras armazenadas e o correspondente controlo positivo, no estudo da estabilidade após o armazenamento das drogas de abuso incluídas neste estudo, em amostras <i>DBS</i> por um período de 8 meses (aprox.), a dois valores de concentração (20 ng/mL e 400 ng/mL) e a três gamas de temperatura ( <i>Tamb.</i> , 2 – 8°C e -10°C).....	127
<b>Tabela A1</b> – Estudo do LD e LQ para a morfina.....	157
<b>Tabela A2</b> – Estudo do LD e LQ para a codeína.....	158
<b>Tabela A3</b> – Estudo do LD e LQ para a 6-monoacetilmorfina.....	158
<b>Tabela A4</b> – Estudo do LD e LQ para a anfetamina.....	159
<b>Tabela A5</b> – Estudo do LD e LQ para o MDA.....	159
<b>Tabela A6</b> – Estudo do LD e LQ para a metanfetamina.....	160
<b>Tabela A7</b> – Estudo do LD e LQ para o MDMA.....	160
<b>Tabela A8</b> – Estudo do LD e LQ para a benzoilecgonina.....	161
<b>Tabela A9</b> – Estudo do LD e LQ para a cocaína.....	161
<b>Tabela A10</b> – Estudo do LD e LQ para o EDDP.....	162
<b>Tabela A11</b> – Estudo do LD e LQ para a metadona.....	162

<b>Tabela B1</b> – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a morfina.....	163
<b>Tabela B2</b> – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a codeína. .....	163
<b>Tabela B3</b> – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a 6-monoacetilmorfina.....	164
<b>Tabela B4</b> – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a anfetamina.....	164
<b>Tabela B5</b> – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para o MDA. .....	165
<b>Tabela B6</b> – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a metanfetamina.....	165
<b>Tabela B7</b> – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para o MDMA.....	166
<b>Tabela B8</b> – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a benzoilecgonina.....	166
<b>Tabela B9</b> – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a cocaína. .....	167
<b>Tabela B10</b> – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para o EDDP.....	167

<b>Tabela B11</b> – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a metadona.....	168
<b>Tabela C1</b> – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a morfina.....	169
<b>Tabela C2</b> – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a codeína.....	169
<b>Tabela C3</b> – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a 6-monoacetilmorfina.	170
<b>Tabela C4</b> – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a anfetamina.....	170
<b>Tabela C5</b> – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para o MDA.....	171
<b>Tabela C6</b> – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a metanfetamina.....	171
<b>Tabela C7</b> – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para o MDMA.....	172
<b>Tabela C8</b> – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a benzoilecgonina.....	172
<b>Tabela C9</b> – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a cocaína.....	173
<b>Tabela C10</b> – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para o EDDP.....	173
<b>Tabela C11</b> – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a metadona.....	174
<b>Tabela D1</b> – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a morfina.....	175
<b>Tabela D2</b> – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a codeína.....	176
<b>Tabela D3</b> – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a 6-monoacetilmorfina.....	177
<b>Tabela D4</b> – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a anfetamina.	178
<b>Tabela D5</b> – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para o MDA.....	179



<b>Tabela D6</b> – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a metanfetamina. .....	180
<b>Tabela D7</b> – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para o MDMA.....	181
<b>Tabela D8</b> – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a benzoilecgonina. .....	182
<b>Tabela D9</b> – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a cocaína.....	183
<b>Tabela D10</b> – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para o EDDP.....	184
<b>Tabela D11</b> – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a metadona.	185
<b>Tabela E1</b> – Estudo da exatidão para a morfina.....	186
<b>Tabela E2</b> – Estudo da exatidão para a codeína.....	186
<b>Tabela E3</b> – Estudo da exatidão para a 6-monoacetilmorfina.....	187
<b>Tabela E4</b> – Estudo da exatidão para a anfetamina.....	187
<b>Tabela E5</b> – Estudo da exatidão para o MDA.....	187
<b>Tabela E6</b> – Estudo da exatidão para a metanfetamina.....	188
<b>Tabela E7</b> – Estudo da exatidão para o MDMA.....	188
<b>Tabela E8</b> – Estudo da exatidão para a benzoilecgonina.....	188
<b>Tabela E9</b> – Estudo da exatidão para a cocaína.....	189
<b>Tabela E10</b> – Estudo da exatidão para a EDDP.....	189

**Tabela E11** – Estudo da exatidão para a metadona..... 189

**Tabela F1** – Resultados obtidos por amostra em relação às substâncias presentes e sua concentração (ng/mL) utilizando as duas metodologias: (A) *SPE-GC/MS* e (B) *DBS-UPLC-MS/MS*; e respetiva diferença percentual (Dif%)..... 190

**Tabela F2** – Resultados obtidos por amostra em relação às substâncias presentes e sua concentração (ng/mL) utilizando as duas metodologias: (A) *SPE-GC/MS* e (B) *DBS-UPLC-MS/MS*; e respetiva diferença percentual (Dif%) (Continuação)..... 191

## SÍMBOLOS, UNIDADES E ABREVIATURAS

%EM	Efeito da matriz
%R	Percentagem de recuperação
6-MAM	6-Monoacetilmorfina
11-OH-THC	11-Hidroxi-tetra-hidrocanabinol
$\delta$	Delta
$\Delta TRR$	Diferença percentual relativa do TRR do analito na amostra em relação ao TRR do analito no controlo
k	Kappa
$\sum ER\%$	Somatório dos erros relativos percentuais
$\mu$	Mu
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrometro
$a$	Interceção da curva no eixo das ordenadas
$A/A_{PI}$	Razão entre as áreas do pico base do analito e do padrão interno
$A_{ID}/A_{PB}$	Razão entre as áreas do ião diagnóstico e do ião pico base
<i>APCI</i>	Do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
$b$	Declive da curva de calibração
<i>Betw. Run</i>	Do inglês <i>Between-run</i>
<i>Bias</i>	Diferença percentual entre o valor estimado e o valor verdadeiro
$^{\circ}\text{C}$	Graus celsius
C6G	Codeína-6-glucuronido

CA	Califórnia
Cal.	Calibrador
C.Final	Concentração final
Coef. Correl.	Coeficiente de correlação
Conc.	Concentração
CP	Controlo positivo
CQ	Controlo de qualidade
CT	Connecticut
CV%	Coeficiente de variação
<i>DBS</i>	Do inglês <i>Dried Blood Spots</i>
<i>DC</i>	Corrente contínua do inglês <i>Direct Current</i>
Desv. Pad.	Desvio padrão
Dif.	Diferença percentual
D.Pad.	Desvio padrão
<i>DUID</i>	Do inglês <i>Driving Under the Influence of Drugs</i>
E%	Erro em relação ao valor teórico
<i>EBF</i>	Do inglês <i>European Bioanalysis Forum</i>
EDDP	2-Etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolideno
ER%	Erro relativo percentual
<i>ESI</i>	Do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
<i>ESI-MS/MS</i>	Do inglês <i>Electrospray Ionization – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
EUA	Estados Unidos da América
eV	Eletrãovolts
<i>FTD</i>	Do inglês <i>Flow-Through Desorption</i>

g	Gramma
GC	Cromatografia Gasosa do inglês <i>Gas Chromatography</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa do inglês <i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>
GHB	Ácido gama-hidroxibutírico do inglês <i>gamma-Hydroxybutyric acid</i>
h	Hora
Hct	Hematócrito
HHA	3,4-Dihidroxianfetamina
HHMA	3,4-Dihidroximetanfetamina
HMA	3-Hidroxi-4-metoxianfetamina
HMMA	4-Hidroxi-3-metoximetanfetamina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ID	Ião diagnóstico
Inc. pad. rel.	Incerteza padrão relativa
INMLCF	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
Int. Tol.	Intervalo de tolerância
IP	Instituto Público
kV	Quilovolt
LC	Cromatografia Líquida do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS	Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massa do inglês <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massa/Massa do inglês <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>

LD	Limite de detecção
<i>LLE</i>	Extração líquido-líquido do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>
L/h	Litros/hora
<i>LOD</i>	Do inglês <i>Limit of Detection</i>
<i>LOQ</i>	Do inglês <i>Limit of Quantification</i>
LQ	Limite de quantificação
Ltd	Limitada
M	Molar
MA	Massachusetts
M3G	Morfina-3-glucuronido
M6G	Morfina-6-glucuronido
<i>MALDI-MS</i>	Do inglês <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MAO	Enzima monoaminoxidase
MDA	3,4-Metilenodioxianfetamina
MDMA	3,4-Metilenodioximetanfetamina
Méd.	Média
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mL/min	Mililitros/minuto
mM	Micromolar
mm	Milímetro
<i>MRM</i>	Do inglês <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
<i>MS</i>	Espectrometria de Massa do inglês <i>Mass Spectrometry</i>

<i>MS/MS</i>	Espectrometria de Massa/Massa do inglês <i>Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
<i>ng/mL</i>	Nanogramas/mililitro
<i>NJ</i>	Nova Jérсия
<i>NP-HPLC</i>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Normal do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography – Normal Phase</i>
<i>NSQAP</i>	Do inglês <i>Newborn Screening Quality Assurance Program</i>
<i>p</i>	Número de ensaios
<i>p.a.</i>	Para análise
<i>PB</i>	Ião pico base
<i>PCR</i>	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>pH</i>	Logaritmo negativo da concentração hidrogeniônica
<i>PI</i>	Padrão interno
<i>PIs</i>	Padrões internos
<i>pKa</i>	Valor negativo do logaritmo da constante de dissociação de um ácido
<i>Prec. Interm.</i>	Precisão intermédia
<i>Q1</i>	Quadrupolo 1
<i>q2</i>	Célula de colisão
<i>Q3</i>	Quadrupolo 3
<i>QqQ</i>	Triplo quadrupolo
<i><math>\bar{R}</math></i>	Recuperação média
<i><math>r^2</math></i>	Coeficiente de correlação
<i>Rec</i>	Recuperação

Recup.	Recuperação
Repetibil.	Repetibilidade
Replic.	Replicado
RF	Radiofrequência
$R_i$	Recuperação média de $n$ replicados obtidos em condições de repetibilidade
<i>RP-HPLC</i>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography – Reverse Phase</i>
rpm	Rotações por minuto
$s$	Desvio padrão
SNC	Sistema nervoso central
<i>SPE</i>	Extração em fase sólida do inglês <i>Solid-Phase Extraction</i>
SQTF	Serviço de Química e Toxicologia Forenses
S/R	Razão sinal/ruído
<i>SRM</i>	Do inglês <i>Single Reaction Monitoring</i>
ST	Sangue total
<i>SWGTOX</i>	Do inglês <i>Scientific Working Group for Forensic Toxicology</i>
$t_{crit.}$	Valor de $t$ crítico
T. Amb.	Temperatura ambiente
Temp. Amb.	Temperatura ambiente
$t_{Exp.}$	Valor de $t$ experimental
THC	Tetra-hidrocanabinol
<i>TOF</i>	Tempo de voo do inglês <i>Time-of-Flight</i>
<i>TQD</i>	Do inglês <i>Triple Quadrupole Detector</i>
TR	Tempo de retenção



TRR	Tempo de retenção relativo
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance do inglês <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra Performance – Espectrometria de Massa/Massa do inglês <i>Ultra Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
$U_{\bar{R}}$	Incerteza da recuperação do método
UV	Ultravioleta
V	Volt
VIH/SIDA	Vírus da Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
v/v	Volume/volume
WADA	Do inglês <i>World Anti-Doping Agency</i>
$w_i$	Fator de ponderação
WLSLR	Do inglês <i>Weighted Least Squares Linear Regression</i>
$x$	Variável independente
$y$	Variável dependente

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a aplicabilidade das *DBS* e suas vantagens no âmbito da toxicologia forense, a partir do desenvolvimento e validação de uma metodologia baseada nesta técnica de amostragem em combinação com a tecnologia *UPLC-MS/MS*, para a confirmação e quantificação de anfetaminas, opiáceos, cocaína, metadona e metabolitos, num total de 11 substâncias. As amostras *DBS*, preparadas a partir de um volume de sangue de 50 µL, foram extraídas com 3 mL de uma mistura metanol/acetonitrilo (3:1, v/v) ao qual foram adicionados os PIs. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Acquity UPLC® HSS T3 (100 mm x 2,1 mm; 1,8 µm) e uma fase móvel formada por acetonitrilo e formato de amónio 2 mM (ácido fórmico 0,1%). A deteção foi concretizada com um espectrómetro de massa/massa triplo quadrupolo operando no modo de ionização *ESI* + e de aquisição *MRM*, com duas transições iónicas por substância. O método demonstrou ser seletivo e o efeito de matriz foi considerado não significativo, com exceção para a morfina e EDDP para as quais se observou uma supressão relevante do sinal, situação corrigida através da utilização dos respetivos análogos deuterados como PIs. A eficiência da extração apresentou recuperações entre 42% e 91%, e não se observaram fenómenos de arrastamento. Apesar do volume pequeno de amostra, a combinação com a técnica analítica de elevada sensibilidade permitiu atingir valores de LD e de LQ baixos, entre 0,5 – 1 ng/mL e 1 – 5 ng/mL, respetivamente. A linearidade foi estudada na gama de trabalho do correspondente LQ a 500 ng/mL, tendo-se obtido  $r^2$  superiores a 0,994, e selecionado o modelo da regressão linear ponderada com um fator de  $1/x$ , para todas as substâncias. O método desenvolvido ofereceu bons resultados para a repetibilidade e precisão intermédia, com CV de 3,8 – 14% e 5,3 – 13%, respetivamente. A exatidão apresentou valores de *bias* entre -9,3% e 7,9%. A experiência para testar a integridade da diluição de amostras *DBS* cuja concentração é superior ao último calibrador, foi avaliada a

uma concentração de 800 ng/mL tendo-se obtido recuperações entre 82% e 102% e  $CV \leq 4,8\%$ . Foi ainda realizado um estudo de estabilidade dos analitos nas *DBS* por um período de armazenamento máximo de 8 meses, a três temperaturas (temp. amb., 2 – 8°C e -10°C), tendo-se obtido os melhores resultados para as amostras a -10°C, com valores de diferença percentual da concentração relativamente aos controlos positivos, inferiores ou iguais  $\pm 15\%$ , para todas as substâncias, e os piores resultados para as amostras armazenadas à temperatura ambiente com sinais de alterações evidentes, no caso, da morfina, 6-MAM, anfetamina, MDA, benzoilecgonina e cocaína. Após a validação, o procedimento foi aplicado a 64 amostras reais (correspondendo a 92 resultados positivos). Os resultados foram comparados com os obtidos a partir de metodologias utilizadas por rotina no SQTF, baseadas em amostras de sangue total preparadas por *SPE* e analisadas por *GC-MS*. Do tratamento estatístico realizado, concluiu-se que, tendo em conta o tipo e diversidade das amostras analisadas, a correlação obtida entre os resultados foi boa. O trabalho desenvolvido e os resultados obtidos neste estudo permitiram avaliar as possibilidades, benefícios e limitações da utilização da técnica de *DBS* na área da toxicologia forense, e concluir que apesar de ainda existir muito trabalho por realizar, os resultados são promissores e as *DBS* podem representar uma alternativa ou um complemento das técnicas analíticas e de amostragem convencionais, podendo dar resposta a algumas das questões presentes nas diferentes aplicações da toxicologia forense.

**Palavras-Chave:** *Dried Blood Spots*; *UPLC-MS/MS*; Drogas de abuso; Validação

## ABSTRACT

The aim of this work was to study the applicability of DBS and its advantages within the forensic toxicology, based on the development and validation of a methodology using this sampling technique in combination with UPLC-MS/MS technology, for confirmation and quantification of amphetamines, opiates, cocaine, methadone and metabolites in a total of 11 substances. The DBS samples were prepared from a blood volume of 50  $\mu$ L, and were extracted with 3 mL of methanol/acetonitrile (3:1, v/v) to which the IS were added. The chromatographic separation was performed using an Acquity UPLC® HSS T3 column (100 mm x 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m) and a mobile phase consisting of acetonitrile and 2 mM ammonium formate (0.1% formic acid). The detection was accomplished with a triple quadrupole mass spectrometer, operating in the ESI+ ionisation and MRM acquisition mode, with two transitions per substance. The method shown to be selective and the matrix effect was considered not significant, except for morphine and EDDP, for which a significant suppression of the signal was obtained. The extraction recoveries were between 42% and 91%, and no carryover was observed. Despite the small sample volume, the combination with a high sensitivity analytical technique allowed to reach low values of LOD and LOQ, ranging from 0.5 to 1 ng/mL and 1 to 5 ng/mL, respectively. The linearity was studied in the range of the corresponding LOQ to 500 ng/mL, with  $r^2 \geq 0.994$  and a weighted  $1/x$  linear regression was selected, for all the substances. The developed method gave good results for intraday and interday precision with CV values of 3.8 to 14% and 5.3 to 13%, respectively. The accuracy presented a *bias* ranging from -9.3% to 7.9%. The dilution integrity of the DBS samples was evaluated at a concentration of 800 ng/mL. Good results were obtained with recoveries between 82% and 102% and  $CV \leq 4.8\%$ . It was also performed a stability study of the analytes in the DBS samples for a maximum storage period of eight months at three different temperatures (room temperature, 2 to 8°C and -10°C). The

best results were obtained for the samples at -10°C, with a percentage difference with respect to the quality control samples concentration, less than or equal to  $\pm 15\%$ , for all the substances. The poorest results were obtained for the samples stored at room temperature, showing obvious concentration deviations in the case of morphine, 6-MAM, amphetamine, MDA, benzoylecgonine and cocaine. After validation, the procedure was applied to 64 real samples (corresponding to 92 positive results). The results were compared with those obtained from the methodologies routinely applied in the SQTF, based on whole blood samples prepared by SPE and analyzed by GC-MS. Taking into account the nature and diversity of the samples analysed, the statistical analysis allowed to established that the correlation between the results was acceptable. To conclude, the work and the results achieved during this study permitted to evaluate the possibilities, benefits and limitations of using the DBS technique in the forensic toxicology field, and to determine, that although there is still much work to be done, the results are promising and DBS can represent an alternative or a complement to conventional analytical and sampling techniques, allowing to respond to some of the present issues concerning the different forensic toxicology applications.

**Keywords:** *Dried Blood Spots*; UPLC-MS/MS; Drugs of abuse; Validation

## 1. INTRODUÇÃO

*DBS* (do inglês *Dried Blood Spots*) é a designação vulgarmente utilizada para descrever a técnica de colheita de amostras de sangue através da difusão deste em papel de filtro próprio, seguido de uma fase de secagem. Esta técnica de amostragem visando posterior extração e análise dos analitos de interesse a partir das amostras de sangue seco, foi pela primeira vez publicada em 1963 por Guthrie e Susi para a determinação de fenilalanina em recém-nascidos, no diagnóstico da doença metabólica hereditária denominada por fenilcetonúria. (Guthrie e Susie, 1963) Desde então têm sido publicadas várias aplicações utilizando a técnica de *DBS* para a determinação qualitativa e quantitativa de marcadores de várias doenças metabólicas genéticas em recém-nascidos, sendo atualmente o método eleito pelos laboratórios clínicos por todo o mundo. (Ambach et al., 2014; Antelo-Domínguez et al., 2013)

A amostragem por *DBS* oferece várias vantagens, nomeadamente, o facto de se tratar de um método simples de colheita, minimamente invasivo, que envolve a recolha de um volume pequeno de amostra, de fácil transporte e armazenamento comparativamente com as técnicas de colheita de sangue total normalmente utilizadas. Permite igualmente reduzir ao mínimo a necessidade do processamento pré-analítico das amostras e inclusive a sua automatização. Para além disso, a *DBS* reduz ao mínimo o risco de infeção associado ao manuseamento das amostras, uma vez que se trata de uma matriz seca, promovendo deste modo a inativação dos agentes patogénicos, nomeadamente do vírus do VIH/SIDA e da hepatite. Permite ainda a estabilização de uma grande variedade de analitos comparativamente com as amostras de sangue total mesmo quando conservadas a baixas temperaturas. Devido às vantagens apresentadas e ao aparecimento de técnicas analíticas mais sensíveis, a microamostragem *DBS*, ao longo das últimas duas décadas, tem vindo a ser cada vez mais adaptada e utilizada no

desenvolvimento e validação de novas metodologias, observando-se um crescimento exponencial das publicações científicas com aplicações nas mais diversas áreas, nomeadamente, em ensaios clínicos e pré-clínicos, em estudos de fármaco-tóxicocinética, na monitorização terapêutica, na gestão de doenças infecciosas, na deteção de fármacos, substâncias ilícitas e seus metabolitos, especialmente em análises realizadas no âmbito da toxicologia forense e da dopagem. Recentemente, a utilização das *DBS* também tem vindo a crescer na bioanálise de moléculas de elevado peso molecular, nomeadamente, na análise de proteínas biologicamente ativas (como sejam, os anticorpos), de proteínas terapêuticas, na pesquisa de biomarcadores e na proteómica. (Ambach et al., 2014; Antelo-Domínguez et al., 2013; Meesters et al., 2013 Rao et al., 2012; Li et al., 2010; Stove et al., 2012)

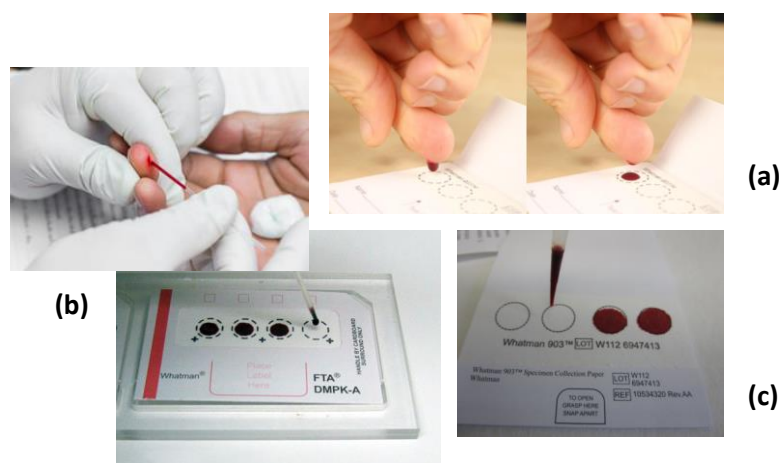
A análise dos analitos-alvo a partir das *DBS* é realizada através da aplicação de várias técnicas analíticas, nomeadamente, por imunoensaio, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (*GC-MS*), cromatografia líquida (*LC*) acoplada a diferentes tipos de detetores, como por exemplo, ultravioleta (*UV*), fluorescência e espectrometria de massa (*MS*), análise de *PCR* (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e *MALDI-MS* (do inglês *matrix-assisted laser desorption ionization*). Para poder tirar partido das vantagens apresentadas pelas *DBS*, as técnicas analíticas devem ter elevada sensibilidade devido ao volume reduzido de matriz biológica utilizada. Os rápidos avanços tecnológicos verificados na última década permitem que atualmente os instrumentos de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa-massa (*LC-MS/MS*) apresentem elevados níveis de sensibilidade e especificidade possibilitando a análise de confirmação qualitativa e quantitativa a partir de amostras *DBS* de substâncias presentes no sangue em baixas concentrações, com especial relevância no contexto forense. (Li et al., 2010; Keevil, 2011; Thomas et al., 2012; Meesters et al., 2013; Stove et al., 2012)

A análise de *DBS* em combinação com a tecnologia *LC-MS/MS* é atualmente uma metodologia bem estabelecida e em desenvolvimento crescente com aplicação diversa, como é o caso da toxicologia forense, face às vantagens anteriormente referidas. (Stove et al., 2012)

### 1.1. *DRIED BLOOD SPOTS*

#### 1.1.1. COLHEITA DAS AMOSTRAS, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DAS *DBS*

A técnica de amostragem *DBS* consiste na colheita de um pequeno volume de sangue obtido a partir de uma picada/punção na ponta do dedo ou no calcanhar (nas aplicações pediátricas), utilizando uma lanceta automática, estéril e descartável. O sangue pode ser colhido diretamente para o papel de filtro, ou através da utilização de microcapilares de precisão que em combinação com dispositivos próprios, permitem controlar o volume de sangue aplicado para produzir a mancha. As *DBS* podem igualmente ser obtidas a partir de um volume exato de sangue previamente colhido por venopunção, utilizando uma micropipeta (**figura 1**).



**Figura 1** – Técnicas de amostragem utilizadas nas *DBS*: (a) aplicação do sangue diretamente do dedo ou calcanhar para o papel de filtro; (b) recolha do sangue e aplicação no papel de filtro recorrendo a um capilar de precisão; (c) aplicação no papel de filtro de um volume exato de sangue venoso com recurso a uma micropipeta.



As amostras obtidas diretamente a partir de uma picada, apresentam a vantagem de ser uma técnica pouco invasiva e facilmente realizada em ambiente não hospitalar e por técnicos minimamente treinados ou inclusive em casa pelos próprios pacientes, por exemplo em situações de monitorização terapêutica. (Déglon et al., 2012; Edelbroek et al., 2009) Contudo, é necessário ter em consideração alguns pormenores importantes relacionados com a forma como é feita a colheita, pormenores esses que podem afetar a qualidade das *DBS*. No procedimento de colheita direta do sangue, o dedo ou o calcanhar deve ser previamente desinfetado, nunca deve tocar o papel de filtro durante a colheita, a primeira gota deve ser rejeitada (para evitar fluídos tecidulares) e nunca se deve produzir manchas a partir da sobreposição de duas ou mais gotas de sangue, ou seja, sempre que uma gota tenha caído sobre o papel nunca se deve colocar nova gota sobre a primeira, mesmo que esta pareça pequena. Estes pormenores são importantes para evitar uma difusão não uniforme do sangue no papel, facto que pode ser crítico numa análise quantitativa. Por outro lado, a colheita direta apresenta como principal inconveniente o facto de não ser possível controlar o volume de sangue colhido. (McDade et al., 2014)

Ao contrário das amostras convencionais de sangue total, soro ou plasma colhidas por venopunção, as *DBS* não requerem o uso de anticoagulantes, não necessitam de ser centrifugadas, separadas, imediatamente refrigeradas ou até mesmo congeladas após a colheita. Uma vez colhidas, as manchas de sangue devem secar, à temperatura ambiente (15 – 22°C), por um período mínimo de 2 a 3 horas ou durante a noite dependendo do tipo de papel e do volume de sangue utilizado. Deve-se evitar a exposição direta das manchas à luz solar e ao calor, não devem ser empilhadas e deve-se evitar o contacto com outras superfícies durante o processo de secagem. (Edelbroeck et al., 2009; Mei et al., 2001; Spooner et al., 2009; Quraishi et al., 2013) Posteriormente, as manchas são cobertas com um papel próprio para impedir o seu contacto

com outras superfícies, e colocadas em bolsas de fecho *zip* pouco permeáveis ao ar ou envelopes hermeticamente fechados, de preferência revestidos de alumínio no caso de analitos sensíveis à luz, contendo saquetas de um agente excicante para proteger as amostras da humidade, uma vez que a sua presença induz o crescimento bacteriano, afeta a eficiência da extração durante a análise e facilita a degradação de analitos instáveis. Deste modo, as amostras estão preparadas para serem armazenadas à temperatura ambiente durante semanas, meses ou até anos, dependendo da estabilidade do analito. Para amostras que contenham analitos instáveis, ou para salvaguardar futuras aplicações, as amostras devem ser armazenadas a baixas temperaturas (refrigeradas ou até mesmo congeladas), sempre que possível. As amostras assim acondicionadas podem igualmente ser enviadas em condições de segurança para o laboratório. Uma cadeia de frio desde o local da colheita da amostra até ao laboratório não é necessário, uma vez que a maioria dos analitos permanece estável nas *DBS* à temperatura ambiente por um período de tempo de uma semana ou mais, sendo igualmente importante proteger as amostras da exposição ao calor. Uma vez que as amostras *DBS* são secas, representam um risco muito reduzido de infeção por agentes patogénicos, pelo que os regulamentos para o seu transporte são bastante menos exigentes, podendo ser facilmente enviadas através do sistema normal de correios. Deste modo, o seu envio para o laboratório é muito menos dispendioso em comparação com as amostras tradicionais de sangue total, soro e plasma. (McDade et al., 2014; Edelbroeck et al., 2009; Mei et al., 2001; Li et al., 2010)

Existem diversos tipos de papel de filtro que se podem utilizar na análise por *DBS* (**figura 2**). Os mais comuns são os papeis de filtro tradicionalmente utilizados na triagem de doenças metabólicas congénitas em recém-nascidos. Estes, são produzidos de acordo com os padrões de qualidade exigidos pelos laboratórios clínicos, a partir de fibras de algodão de elevada pureza constituídas essencialmente por celulose, com vista a obter uma correta e reprodutível absorção

das amostras de sangue. O desempenho dos papéis de filtro utilizados para a colheita de sangue nos procedimentos de triagem neonatal é monitorizado pelo *Newborn Screening Quality Assurance Program (NSQAP)* que verifica o processo de produção e assegura que os novos lotes de papel cumprem todas as diretrizes estabelecidas por forma a garantir que o produto se comporta de forma semelhante ao lote anterior. (Edelbroeck et al., 2009)



**Figura 2** – Exemplos de tipos de cartões utilizados nas DBS (Whatman® 903; Whatman® BFC 180; Whatman® FTA DMPK-A, B, ou C e o FTA Elute; Bond Elut DMS).

De entre os papéis de filtro de celulose, o papel Whatman® 903 (GE *Healthcare*, Piscataway, NJ, EUA) é o papel de filtro mais utilizado na colheita de amostras DBS. Foi originalmente desenvolvido no início da década de 1960 com o objetivo de facilitar a colheita de amostras a partir de uma picada no calcanhar de recém-nascidos (Guthrie e Susi, 1963). Este tipo de papel é muitas vezes designado por “cartões de Guthrie” em reconhecimento dos esforços despendidos pelo Dr. Robert Guthrie no desenvolvimento de métodos inovadores para a triagem de doenças metabólicas congénitas. Para além deste, existem outros papéis igualmente produzidos à base de celulose, nomeadamente: o Ahlström 226 (ID Biological Systems, Greenville, SC), o Sartorius TFN (Sartorius AG, Goettingen, Alemanha), o Whatman® BFC 180, o Whatman® FTA DMPK-A, B, ou C e o FTA *Elute* (GE *Healthcare*, Piscataway, NJ,

EUA). Os cartões FTA DMPK são mais utilizados em estudos de farmacocinética e toxicocinética, enquanto que os FTA *Elute* são principalmente indicados para a colheita e análise de DNA. Todos os cartões DMPK estão disponíveis em dois formatos: normal ou com indicador. Os cartões com indicador são especialmente úteis para matrizes biológicas incolores, como por exemplo, a urina, o plasma, o fluido sinovial e cerebrospinal, uma vez que mudam de cor em contacto com a amostra. Os cartões FTA DMPK-A e B são quimicamente tratados com reagentes próprios que em contacto com a amostra promovem a lise das membranas celular e nuclear das células, a desnaturação das proteínas, a inativação das enzimas e impedem o crescimento bacteriano, conduzindo a uma maior estabilidade dos analitos. Contudo, existem algumas dúvidas relativamente à compatibilidade dos reagentes químicos utilizados no tratamento dos cartões com as técnicas de espectrometria de massa. (Keevil et al., 2011; Sharma et al., 2014) Pelo contrário, os cartões Whatman® BFC 180, FTA DMPK-C e Ahlstrom 226 não são submetidos a nenhum tipo de pré-tratamento, pelo que não possuem na sua composição substâncias químicas que possam interferir na análise. Por outro lado, existem os cartões Bond Elut DMS produzidos pela empresa Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA), constituídos por um material diferente da celulose que, de acordo com o fabricante, reduz o efeito do hematócrito, a formação de ligações não-específicas, melhorando a resposta analítica nos espectrómetros de massa e aumentando a razão sinal/ruído (Hudson et al., 2011; Sharma et al., 2014). Contudo, este tipo de papel apresenta uma textura muito menos rígida o que torna o seu manuseamento mais difícil, nomeadamente no processo de remoção manual da mancha. (Sadones et al., 2014; McDade et al., 2014)

O volume de sangue tipicamente utilizado para produzir as *DBS* varia entre 5 e 100  $\mu\text{L}$ . Contudo, é importante ter em atenção que as manchas de sangue produzidas a partir de volumes maiores, nomeadamente, valores superiores a 50  $\mu\text{L}$  muito dificilmente se poderão obter a partir

de uma punção no dedo ou calcanhar, pelo que estes volumes de sangue são utilizados em situações em que a aplicação do sangue no papel é feita a partir da pipetagem de um volume fixo de sangue colhido previamente por venopunção. As *DBS* preparadas a partir de medições volumétricas exatas são normalmente utilizadas em situações em que toda a mancha de sangue é analisada. Pelo contrário, quando as *DBS* são obtidas a partir da aplicação direta no papel através de uma punção ou picada, tipicamente um pequeno disco de papel (por exemplo, com um diâmetro de 3 a 6 mm, aproximadamente) é retirado da *DBS* para análise. A grande vantagem da análise realizada a partir da mancha completa é o facto de evitar em grande parte o efeito do hematócrito e simplificar o processo de validação do método. Pelo contrário, a análise parcial da *DBS* implica uma menor quantidade de amostra disponível para a análise, pelo que aumenta a necessidade de uma maior sensibilidade das técnicas analíticas utilizadas e a necessidade de um procedimento de validação mais elaborado. (Denniff et al., 2010)

Curiosamente, a grande maioria das publicações disponíveis descreve a análise de *DBS* obtidas a partir da pipetagem de amostras de sangue venoso já existentes no laboratório, em detrimento de amostras obtidas a partir de sangue capilar. (Sadones et al., 2014)

#### 1.1.2. PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS *DBS*

A extração dos analitos a partir das *DBS* é normalmente realizada de forma manual envolvendo algumas etapas. Inicialmente os cartões são perfurados ou recortados retirando uma determinada área que pode corresponder apenas a parte da mancha de sangue seco ou a sua totalidade. É o caso, por exemplo, dos estudos levados a cabo envolvendo pacientes em ambiente hospitalar, ou no contexto da toxicologia forense, quando se trata da análise de amostras *postmortem*, onde, por norma, é utilizada a totalidade da mancha de sangue na análise, com a aplicação volumétrica do sangue no cartão/papel, dado que o sangue *post-mortem*

encontra-se frequentemente hemolisado, o que leva a que a sua difusão no papel de filtro seja diferente da que se verifica com o sangue fresco. (De Kesel et al., 2013)

Na análise da totalidade da mancha, genericamente, existem referenciadas na literatura duas estratégias. A mais frequente é a de retirar a *DBS* do cartão após aplicação volumétrica do sangue. (Li et al., 2010; Ingels et al., 2010; Hernández Redondo et al., 2013; Garcia Boy et al., 2008) Contudo, existe uma segunda abordagem que consiste na aplicação volumétrica do sangue em discos de papel previamente recortados/perfurados dos cartões. (Youhnovski et al., 2011; Li et al, 2010a; Li et al 2012; Meesters et al., 2012) Nesta última opção existem dois procedimentos diferentes. Os discos de cartão são previamente recortados, de seguida são novamente colocados no papel de filtro e posteriormente é aplicado um determinado volume de sangue (Li et al, 2010a; Li et al 2012), ou os discos de papel são recortados, colocados num sistema de suporte próprio e posteriormente é feita a aplicação volumétrica do sangue. (Youhnovski et al., 2011)

Uma vez obtida a mancha de sangue seco a analisar, esta é colocada num tubo de ensaio ou vial. De seguida, os analitos são normalmente extraídos do papel através da utilização de um solvente orgânico, aquoso ou uma mistura dos dois, ao qual geralmente é adicionado o correspondente padrão interno (PI) deuterado. O solvente de extração selecionado deve ser suficientemente forte para romper as ligações do analito às proteínas da matriz ou ao material do papel de filtro. Contudo, é preciso ter em atenção que a utilização de misturas de solventes aquosos com solventes orgânicos polares solúveis em água (como, por exemplo, o metanol e o acetonitrilo) tipicamente originam extratos com uma coloração avermelhada resultante da co-extração de componentes da matriz (nomeadamente, da hemoglobina e outras proteínas), que podem causar a supressão ou intensificação do sinal analítico resultante da co-eluição destes

com os analitos-alvo durante a análise. Pelo contrário, misturas contendo uma percentagem de água muito reduzida ou a utilização de solventes orgânicos puros resultam em extratos muito mais limpos e, conseqüentemente, com menor percentagem de possíveis interferentes. A dessorção dos analitos das manchas de sangue pode ser realizada por infusão passiva do papel de filtro, porém, na maior parte das aplicações a extração é facilitada através da utilização de um, ou da combinação de alguns dos seguintes passos: agitação, sonicação, aquecimento e centrifugação. Uma vez extraídos os analitos, pode-se proceder à análise do extrato, diretamente ou após um passo de diluição. Contudo, dependendo do solvente de extração utilizado, poderá ser necessário recorrer a outros passos de pré-tratamento das amostras, como sejam, a precipitação de proteínas, a extração líquido-líquido e/ou em fase sólida, vulgarmente designada por *SPE*, e/ou a evaporação do solvente de extração e posterior reconstituição do extrato seco num solvente mais adequado para a análise. Este último passo pode oferecer como vantagem a concentração da amostra e conseqüente aumento da sensibilidade. (Meesters et al., 2013; Sadones et al., 2014) Nas análises que requerem um passo de derivatização, existe a possibilidade de simplificar a fase de preparação pré-analítica das amostras realizando este passo diretamente na mancha. É o caso do método desenvolvido por Ingels et al. para a quantificação do ácido gama-hidroxibutírico (*GHB*) por *GC-MS*. Esta opção consiste na adição dos reagentes de derivatização diretamente no papel de filtro, sem o uso prévio de solventes de extração, seguido de um passo de secagem e de redissolução num solvente adequado, resultando na redução do pré-tratamento das amostras e no tempo despendido para tal. (Ingels et al., 2010; Ingels et al., 2011)

Apesar dos esforços para aumentar a eficiência do pré-tratamento manual das amostras *DBS*, este continua a ser um processo algo moroso, dependendo do número de passos necessários para a obtenção de um extrato adequado à análise instrumental, tornando-se muitas vezes num

importante obstáculo para uma utilização mais abrangente das análises por *DBS* na rotina dos laboratórios, pelo que, têm vindo a ser desenvolvidas novas alternativas mais eficientes.

Nos últimos anos, tem-se vindo a verificar o investimento na automatização das análises por *DBS* com o desenvolvimento e introdução de tecnologia de extração *online* específica. Déglon et al. foram os primeiros a desenvolver o conceito de dessorção *online* a partir das *DBS*. (Déglon et al., 2009) Pouco tempo depois, investigadores do mesmo laboratório publicaram um trabalho onde aplicaram o mesmo conceito para a análise de drogas de abuso. (Thomas et al., 2010). O sistema adotado consiste primeiramente na perfuração do cartão com a remoção da totalidade da mancha de sangue seco que é colocada numa célula de dessorção em aço inoxidável criada para o efeito no próprio laboratório encontrando-se esta diretamente ligada a um equipamento *LC*. Utilizando um sistema de comutação de colunas (*column switching*), os analitos são primeiro dessorvidos do papel de filtro colocado na célula e seguidamente analisados. Um protótipo aperfeiçoado, baseado num prato giratório automático que pode suportar um maior número de manchas previamente perfuradas manualmente das amostras *DBS*, foi implementado para a análise de drogas de abuso, nomeadamente, cocaína e seus metabolitos, opiáceos, anfetaminas e benzodiazepinas. (Lauer et al., 2011; Déglon et al., 2012). Atualmente, já existem três empresas que oferecem sistemas totalmente automatizados para o pré-tratamento e injeção direta nos sistemas analíticos das amostras *DBS*. A empresa CAMAG (Suíça) desenvolveu um sistema designado por *DBS-MS 500*, que permite a manipulação de até 500 cartões *DBS*, de forma totalmente automatizada, inclui um sistema de reconhecimento ótico dos cartões e um sistema de leitura de código de barras, uma estação de lavagem integrada para eliminar os fenómenos de arrastamento (*carryover*), sistema automático de adição do PI e pode ser acoplado a sistemas *LC-MS* e *MS*. ([www.camag.com](http://www.camag.com)) Por outro lado, a empresa Prolab GmbH (Reinach, Suíça) introduziu no mercado o sistema designado por *DBS SCAP system*, cujo



princípio de funcionamento é semelhante ao do sistema *DBS-MS 500*, com a diferença que o procedimento de extração do equipamento da Prolab é realizado através de um sistema de fixação dos cartões que permite trabalhar a pressões de até 200 bar. O sistema permite igualmente a adição *online* do PI durante a extração, e inclui uma pré-coluna *SPE* que é utilizada para a limpeza da amostra. Após adsorção e eluição da coluna *SPE*, a amostra é introduzida no analisador através de um sistema de comutação de colunas. ([www.prolab.ch](http://www.prolab.ch)) A Spark Holland (Emmen, The Netherlands) desenvolveu o equipamento *DBS Autosampler<sup>TM</sup>* equipado com um sistema patenteado designado por *FTD<sup>TM</sup>* (do inglês *Flow-through desorption*) especialmente desenhado para a eluição das manchas de sangue seco e que pode ser acoplado a outros sistemas analíticos nomeadamente, para extração e limpeza das amostras, designadamente por *SPE* e/ou análise direta, com a possibilidade de funcionamento *online* com equipamentos *LC-MS/MS*. À semelhança dos outros sistemas também possui um sistema de leitura de código barras e permite a adição automática do PI. ([www.sparkholland.com](http://www.sparkholland.com))

A utilização de sistemas automáticos na análise de amostras *DBS* pode traduzir-se numa diminuição significativa do tempo necessário para a preparação das amostras, no aumento da sensibilidade e da reprodutibilidade dos ensaios uma vez que a desorção dos analitos de interesse pode ser feita diretamente para o interior dos sistemas analíticos. Apesar das vantagens, os sistemas de extração *online* foram introduzidos no mercado há relativamente pouco tempo e são muito mais complicados de implementar em comparação com a extração manual. Para além disso, esta última é muito mais económica, uma vez que não requer a aquisição de qualquer tipo de equipamento adicional reconhecidamente dispendioso, pelo que a extração manual ainda é manifestamente a opção mais comum na maior parte das aplicações existentes para a técnica de *DBS*. (Meesters et al., 2013; Sadones et al., 2014)

### 1.1.3. LIMITAÇÕES DA TÉCNICA DE *DBS* E CARACTERÍSTICAS COM IMPACTO NUMA ANÁLISE QUANTITATIVA

Apesar da técnica de microamostragem por *DBS* ter alcançado um enorme êxito na área da bioanálise e de ter experimentado nas duas últimas décadas um interesse crescente em diversas outras áreas, apresenta igualmente algumas desvantagens, nomeadamente, o facto de não ser adequada à análise de substâncias voláteis ou sensíveis ao ar, a limitação na repetição ou na realização de novas análises para a pesquisa de metabolitos ou de outras moléculas e a necessidade de utilização de técnicas analíticas de elevada sensibilidade, devido ao volume reduzido de amostra utilizado. Para além disso, ao longo dos últimos anos tem-se vindo a verificar que existem alguns fatores que merecem especial atenção, uma vez que podem ter um impacto significativo na exatidão e precisão dos resultados obtidos numa análise quantitativa de amostras *DBS*. Entre esses fatores contam-se, o efeito do hematócrito (Hct), o efeito cromatográfico (homogeneidade), o tipo de colheita e o volume de amostra, o diâmetro da mancha utilizado na análise (parcial ou total), a eficiência da extração, a adição do PI, a preparação dos calibradores e controlos de qualidade, o procedimento de diluição das amostras, sangue venoso *versus* capilar e a estabilidade dos analitos no papel de filtro. (Timmerman et al., 2011)

#### **Efeito do hematócrito**

O hematócrito (Hct) é a fração de volume ocupado pelos glóbulos vermelhos ou eritrócitos no volume total do sangue e é determinado pela quantidade e pelo tamanho (volume) destas células. Apesar de existirem intervalos de referência para distintos grupos populacionais, verificam-se diferenças significativas inter- e intra-individuais. Entre os fatores que influenciam o valor de Hct estão: a idade, o sexo, o estado de saúde e de nutrição. Os intervalos de referência

para o homem e para a mulher são aproximadamente 0,41 a 0,50 e 0,36 a 0,44, respetivamente. (Denniff et al., 2010) Tipicamente, observam-se valores mais elevados de Hct para os recém-nascidos, em pessoas que vivem a elevadas altitudes, assim como em pessoas que sofrem, por exemplo, de policitemia ou de doença pulmonar obstrutiva crónica. Por outro lado, indivíduos com anemia possuem valores de Hct mais baixos. São exemplos, os pacientes sujeitos a quimioterapia e pacientes com o sistema imunológico comprometido, cujos valores de Hct podem situar-se entre 0,20 e 0,30. (De Kesel et al., 2013)

O Hct é atualmente considerado o parâmetro mais importante com potencial impacto direto nos resultados quantitativos de uma análise por *DBS*. O principal factor de impacto reside no facto de o Hct estar diretamente relacionado com a viscosidade do sangue, logo tem influência direta na sua difusão no papel de filtro. Nos papeis de filtro tradicionais à base de celulose, como, por exemplo, o Whatman® 903, o FTA® DMPK-C ou o Ahlstrom 226, o sangue com elevado Hct difunde menos do que o sangue com menor valor, o que significa que as manchas de sangue seco apresentam um diâmetro tanto menor quanto maior for o valor do Hct. (Denniff et al., 2010) Consequentemente, quando uma *DBS* de um sangue com elevado Hct é perfurada para retirar uma parte da mancha com um determinado diâmetro, esta porção da mancha contém maior volume de sangue do que o mesmo diâmetro de mancha perfurado numa *DBS* de menor Hct. (Denniff et al, 2010; O’Broin 1993; Mei et al., 2001) Deste modo, se uma curva de calibração for preparada utilizando um sangue de Hct intermédio, pode vir a resultar numa subestimação do valor de concentração obtido no caso de amostras *DBS* de baixo Hct ou numa sobrestimação para amostras com elevado Hct.

**Efeito cromatográfico**

Para além da difusão diferencial do sangue no papel de filtro em função do Hct, também tem sido documentado em diversos estudos que os analitos podem sofrer uma distribuição não homogénea no papel de filtro, designado por efeito cromatográfico, devido à interação do sangue e/ou do analito com o material do cartão *DBS*, à medida que o sangue se espalha ou é adsorvido no papel, o que ficou demonstrado pela diferença de concentrações obtida a partir da análise de uma porção da parte periférica da mancha *versus* parte central. Esta diferença de concentrações depende não só do analito (das suas propriedades químicas e físicas, nomeadamente, da afinidade às células do sangue, da maior ou menor ligação ao plasma, do peso molecular, do pKa, da hidrofobicidade, etc.), do tipo de cartão, mas também depende do Hct. Estando mais presente quanto maior o volume de amostra utilizado para preparar as manchas de sangue e menor o seu Hct, uma vez que nestes casos se verifica uma maior dispersão radial da amostra. (O'Mara et al., 2011; Cobb et al., 2013; Mei et al., 2001)

Para poder evitar a influência do efeito do Hct relacionado com a maior ou menor difusão do sangue e o efeito cromatográfico na distribuição não uniforme dos analitos no papel, a forma mais simples e fiável é através da análise da totalidade das *DBS*, em vez de utilizar apenas uma porção da mancha na análise. Contudo, é importante ter presente que a opção de analisar a totalidade da mancha de sangue seco, significa que, por um lado, não será possível reanalisar a amostra a não ser que exista uma segunda mancha que corresponda a uma réplica igual à primeira, e por outro lado, a análise da totalidade da mancha envolve necessariamente a aplicação de um volume exato de sangue nos cartões, o que implica que a colheita deve ser realizada preferencialmente em ambiente controlado e por pessoal qualificado. (De Kesel et al., 2013; Li et al., 2010)

Como alternativa para tentar minimizar a influência do Hct e da homogeneidade das amostras, existe também a possibilidade de experimentar outros cartões, uma vez que estes efeitos dependem não só do analito, mas também do tipo de cartão. Atualmente, já existem cartões que foram especialmente desenvolvidos com o objetivo de tentar reduzir estes efeitos diretamente dependentes do Hct. É o caso, por exemplo, do papel de filtro especial, designado por Bond Elut DMS, preparado a partir de um material diferente da tradicional celulose, que garante sofrer menos dos efeitos do Hct. Ou seja, neste tipo de material, a aplicação de amostras com diferentes valores de Hct resultam em menores variações no diâmetro das manchas quando comparado com os papéis de filtro clássicos de celulose. (Arora et al., 2013) Contudo, este tipo de material apresenta uma muito menor rigidez quando comparado com os papéis de filtro tradicionais, o que de acordo com a experiência de alguns autores, cria algumas dificuldades na perfuração manual dos cartões. Para além disso, verificou-se que o sangue nem sempre difundia uniformemente através do papel, comprometendo igualmente desta forma a reprodutibilidade dos discos resultantes da perfuração dos cartões. (De Kesel et al., 2013)

### **Eficiência da extração**

De acordo com a literatura, o Hct também pode ter impacto na eficiência da extração, sendo que o efeito na recuperação pode variar consideravelmente de analito para analito e também dependendo do tipo de cartão. Ou seja, enquanto que, para algumas substâncias, se verifica que a recuperação permanece mais ou menos constante ao longo de um determinado intervalo de valores de Hct, para outras, a recuperação pode aumentar ou diminuir com o aumento do Hct. Por outro lado, dependendo do tipo de cartão, podem-se verificar comportamentos diferentes para uma mesma substância. (de Vries et al., 2013) O efeito do Hct na recuperação foi observado, por exemplo, na análise do naproxeno a partir das DBS. (Youhnovski et al., 2011)

Contudo, é preciso ter em atenção durante o desenvolvimento e validação de um processo de extração, que a recuperação também pode sofrer variações com o envelhecimento das amostras *DBS*, e que diferentes valores de Hct também podem dar origem a diferentes efeitos de matriz, nomeadamente, com a supressão ou intensificação do sinal analítico. (De Kesel et al., 2013; de Vries et al., 2013) Porém, neste caso, e para métodos cujo padrão interno (PI) corresponde a um isótopo estável, as diferenças relacionadas com o efeito matriz associado a diferentes valores de Hct são compensadas. Já o mesmo não se pode garantir para substâncias onde apenas um análogo estrutural for utilizado, onde as flutuações observadas na recuperação associadas ao Hct podem ser atribuídas ao efeito matriz ou a uma combinação de ambos, efeito matriz e recuperação. (de Vries et al., 2013)

No que diz respeito às possíveis flutuações da recuperação em função do Hct, a solução passa necessariamente pela otimização das condições de extração dos analitos, de modo a obter uma eficiência de extração consistente para diferentes valores de Hct, tanto em amostras *DBS* preparadas recentemente, como em antigas, mesmo em situações de análise da totalidade da mancha de sangue seco. (de Vries et al., 2013)

### **Estabilidade dos analitos nas *DBS***

Para além de alterações na recuperação devido ao envelhecimento das amostras, os analitos também podem sofrer modificações durante o armazenamento devido à presença de enzimas ou de outros químicos (apesar de, tipicamente, se verificar um aumento da estabilidade dos analitos nas *DBS* quando comparadas com as amostras líquidas armazenadas sob as mesmas condições). A estabilidade dos analitos pode ser influenciada por diversos fatores, nomeadamente, o tipo de papel de filtro, a temperatura, a humidade e o tempo de armazenagem. (Demirev et al., 2012) Pelo que, é importante estudar a influência destes parâmetros na

estabilidade dos analitos durante o procedimento de validação, de modo a poder concluir sobre quais as melhores condições de armazenamento das amostras *DBS*.

### **Adição do padrão interno**

O padrão interno (PI) é uma substância que deve ter uma estrutura análoga ao analito, de preferência um isótopo estável, nomeadamente, um equivalente deuterado. O PI é adicionado numa quantidade idêntica a todas as amostras de uma sequência analítica (calibradores, controlos e amostras reais) e serve para compensar as flutuações relacionadas com a recuperação do analito durante a preparação das amostras e com a resposta do mesmo durante a análise. No caso das matrizes biológicas convencionais (como sejam, o sangue, o plasma e a urina), o PI é facilmente adicionado à amostra líquida e homogeneizado, obtendo-se uma distribuição uniforme na amostra tal como acontece com o analito. No que diz respeito às amostras sólidas, como sejam as *DBS*, o mesmo já não se verifica. (Meesters et al., 2013; Timmerman et al., 2011a)

Existem diversas formas de adição do PI descritas na literatura, sendo que a mais frequente é a adição ao solvente de extração. Para além desta, existem outras abordagens, que têm sido investigadas e/ou aplicadas, nomeadamente, a adição direta à mancha de sangue seco (Déglon et al., 2011; Mercolini et al., 2010), a pulverização (*spraying*) (Abu-Rabie et al., 2011; Zimmer et al., 2013), a aplicação do PI no cartão antes da mancha de sangue (Abu-Rabie et al., 2011; Manicke et al., 2011; Mommers et al., 2013), e inclusive a adição do PI às amostras antes de produzir as manchas de sangue (Antelo-Domínguez et al., 2013). Todos os procedimentos de adição propostos apresentam as suas vantagens e inconvenientes em termos analíticos e procedimentais. Todavia, de acordo com a literatura, nenhum cumpre todos os requisitos estabelecidos no âmbito da bioanálise para todos analitos testados, com exceção do método de

adição de PI às amostras de sangue antes de serem aplicadas ao papel de filtro. Porém, este último é bastante complicado e altamente impraticável uma vez que, neste caso, o PI deverá ser adicionado ao sangue imediatamente antes da sua aplicação no papel de filtro, através da pipetagem de um volume pré-definido, situação que pode ser bastante complexa ou até impossível na generalidade das aplicações da técnica de amostragem por *DBS*, com exceção da utilização desta técnica, apenas como uma alternativa de pré-tratamento das amostras.

No que diz respeito ao método atualmente mais utilizado, o da adição do PI ao solvente de extração, é muito importante ter presente, que neste caso, o PI não permite corrigir as possíveis flutuações na recuperação dos analitos do papel de filtro, funcionando como um padrão externo. Torna-se, pois, especialmente importante avaliar as possíveis diferenças entre o comportamento do analito (que é dessorvido da mancha de sangue seco) e o PI (adicionado no solvente de extração), uma vez que se podem verificar diferenças significativas na eficiência da extração, dependendo do analito-alvo, das características físicas e químicas próprias da amostra e também em função do tempo de armazenagem das manchas de sangue seco até ao momento da análise, diferenças essas que podem ter impacto na exatidão e precisão do método. Assim sendo, é recomendável que o procedimento de preparação das amostras desenvolvido apresente uma eficiência de extração constante sob as mais diversas condições, nomeadamente, de hematócrito e de idade das amostras. (Timmerman et al., 2011a; Timmerman et al., 2013)

Concluindo, não existe uma abordagem única no que diz respeito à adição do PI na análise por *DBS*, que satisfaça todos os analitos. O desempenho individual para determinadas substâncias pode ser tão fraco que não se consiga estabelecer uma metodologia analítica aceitável. Nestas situações, a solução pode passar pela revisão do procedimento de preparação das amostras com a inclusão de condições de extração mais rigorosas que possam compensar as flutuações



devidas ao Hct e ao decréscimo ou incremento na recuperação devido ao envelhecimento das amostras *DBS*. Por outro lado, existem procedimentos que parecem funcionar perfeitamente com o método de adição do PI ao solvente de extração, mesmo em situações de análise de amostras *DBS* antigas. Aparentemente, não existe forma de prever o comportamento dos analitos de acordo com a sua estrutura e propriedades moleculares intrínsecas, pelo que, a validação dos métodos por *DBS* deve ser considerado como um processo individual, uma vez que depende do analito. (van Baar et al., 2013)

### **Preparação dos calibradores e controlos de qualidade**

Numa análise quantitativa, os calibradores e os controlos de qualidade devem simular as amostras em estudo. Normalmente, estas amostras são preparadas a partir da adição ao sangue, de uma quantidade adequada de uma solução-padrão *stock* ou de trabalho preparada num solvente orgânico e/ou aquoso, de modo a obter uma amostra com um valor de concentração intermédio, a partir da qual se fazem diluições sucessivas de modo a obter os valores de concentração definidos para os calibradores e controlos de qualidade. Uma vez que a técnica de amostragem *DBS* envolve normalmente volumes de amostra muito reduzidos, é extremamente importante minimizar o volume das soluções-padrão adicionadas às amostras, em particular a percentagem de componentes não aquosos (de preferência, <5% do volume final), de modo a prevenir o aparecimento de efeitos do solvente que podem provocar diferenças significativas entre as amostras fortificadas e as amostras reais. Aspectos como a diluição das amostras podem influir na formação da mancha, na distribuição dos compostos no papel de filtro, na hemólise das amostras e no tempo de secagem. Adicionalmente, é importante ter em atenção que a dinâmica relacionada com o tempo de equilíbrio dos analitos nas amostras fortificadas comparativamente com as amostras reais pode diferir, pelo que se deve ter especial

atenção à homogeneidade quando se trata da manipulação de pequenos volumes de amostra durante o passo de fortificação. A opção de utilizar a preparação antecipada de volumes maiores de sangue fortificado para preparar os calibradores e controlos é aceitável desde que se tenha em atenção que os mesmos sejam utilizados durante o período de estabilidade devidamente documentado. (Timmerman et al., 2011a; Li et al., 2010)

### **Diluição das amostras**

Por outro lado, existem situações em que a concentração do analito ultrapassa o limite superior da curva de calibração. Nestas situações, a diluição das amostras biológicas fluidas é um processo muito mais simples quando comparado com as amostras secas, como sejam as *DBS*. Devido às limitações inerentes a esta técnica, as amostras *DBS* não podem ser diluídas de forma direta como no caso das amostras líquidas, pelo que, a estratégia mais utilizada consiste na diluição da amostra após extração com um extrato obtido a partir de uma amostra *DBS* preparada a partir de um sangue branco.

### **Tipo de sangue (capilar versus venoso)**

Por último, importa ainda referir que, nos casos em que as manchas de sangue são produzidas a partir de uma pequena punção ou picada, situação preferencial nas amostras colhidas *in vivo*, como por exemplo, na monitorização terapêutica ou em estudos realizados com voluntários, nomeadamente em ensaios clínicos, é importante ter presente que, para determinados analitos, existe a possibilidade da concentração no sangue capilar diferir do valor obtido a partir do tradicional sangue colhido por venopunção, pelo que, nestas situações, é importante realizar um estudo comparativo entre os resultados obtidos a partir do sangue capilar *versus* sangue venoso para poder avaliar se a técnica *DBS* será adequada para a análise desses analitos. (Sharma et al., 2014)

## 1.2. TÉCNICAS INSTRUMENTAIS UTILIZADAS NA ANÁLISE DAS *DBS*

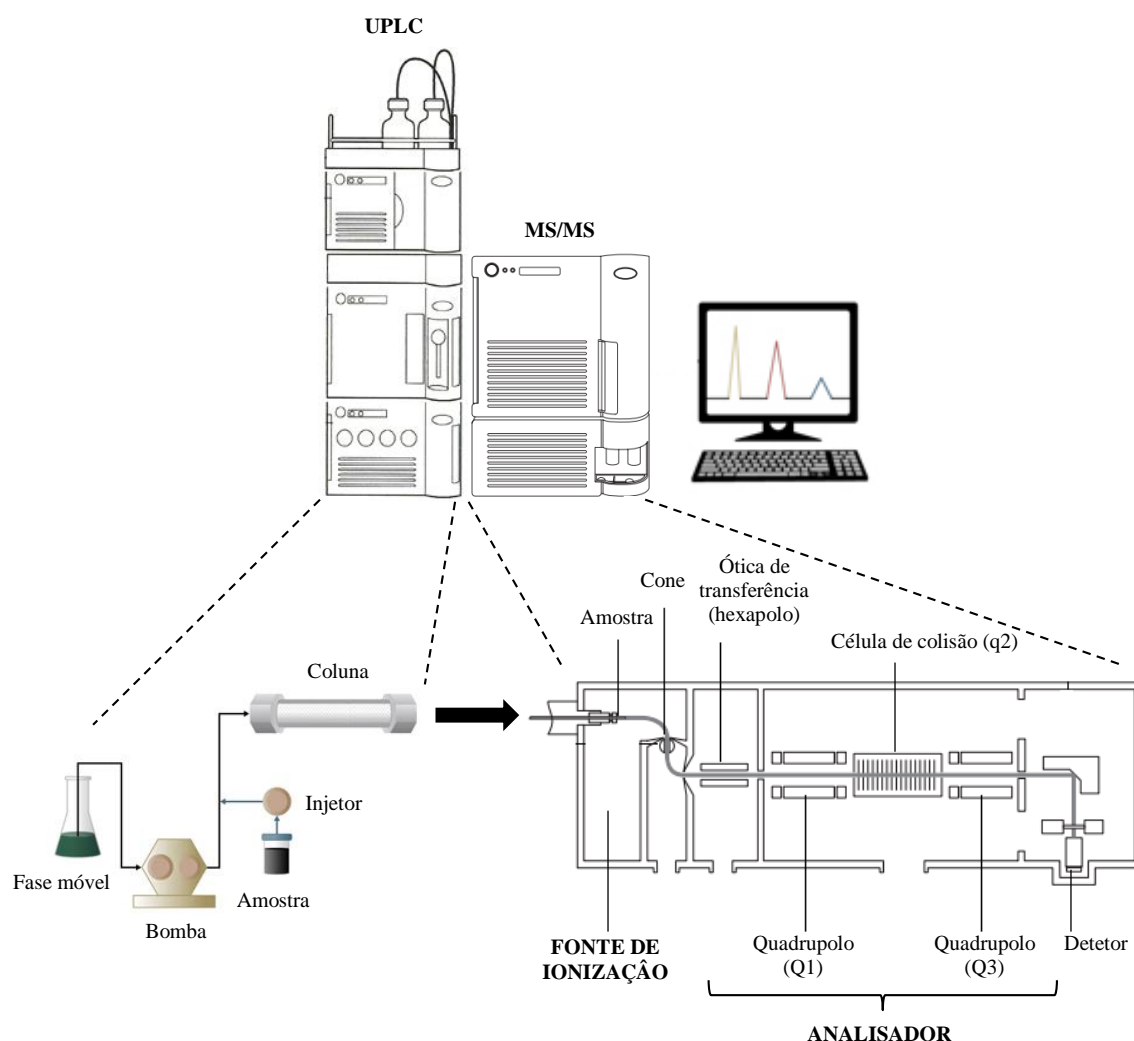
A análise das amostras *DBS* pode ser realizada através da utilização de várias técnicas instrumentais de acordo com a sua aplicação. Para a análise de moléculas de baixo peso molecular as técnicas analíticas mais utilizadas são: os imunoensaios; a cromatografia líquida (*LC*) acoplada a detetores de ultravioleta (*UV*) e de fluorescência; a cromatografia gasosa (*GC*) e o *LC* acoplado à espectrometria de massa (*MS*), e espectrometria de massa-massa ou em *tandem* (*MS/MS*).

Durante muitos anos, os imunoensaios foram a técnica analítica mais utilizada para a análise de moléculas pequenas a partir de amostras *DBS*. Contudo, apesar dos imunoensaios serem técnicas rápidas e de elevado grau de automatização, requerem muitas vezes a manipulação de materiais radioativos, e os resultados obtidos são pouco específicos/seletivos, não identificando os analitos que possam estar presentes nas amostras, apenas detetando compostos com estruturas químicas semelhantes, que pertençam ao mesmo grupo ou família, sendo igualmente suscetíveis à reatividade cruzada com outros compostos presentes na amostra e que interferem com a análise, pelo que, é essencial que o resultado, quando positivo, seja confirmado através da realização de uma análise adicional utilizando métodos instrumentais mais específicos e seletivos. As técnicas analíticas baseadas no *LC* acoplado aos detetores de *UV* e de fluorescência, de um modo geral apresentam maior seletividade quando comparadas com os imunoensaios, devido à utilização da separação cromatográfica dos analitos de interesse da maioria dos potenciais interferentes presentes na amostra. Contudo, os métodos desenvolvidos para a análise das amostras *DBS* utilizando este tipo de detetores estão limitados à quantificação de substâncias presentes nas amostras em elevadas concentrações, devido à baixa sensibilidade apresentada por estas tecnologias, aliado ao facto de se utilizarem volumes muito pequenos de

amostra nas *DBS*. A aplicação do *GC-MS* significou um incremento substancial na sensibilidade e seletividade, contudo a necessidade de tempos de análise e de preparação das amostras normalmente longos, muitas vezes com a necessidade de inclusão de um passo de derivatização para muitos analitos, é encarado muitas vezes como uma forte desvantagem. A introdução, no início da década de 1990, da tecnologia *MS/MS* associada às técnicas de *GC* e *LC*, com a possibilidade de trabalhar nos modos de aquisição *SRM* (do inglês *single reaction monitoring*) e *MRM* (do inglês *multiple reaction monitoring*), significou o aumento da sensibilidade e da seletividade, permitindo a identificação dos analitos mesmo em situações de má resolução cromatográfica. Na última década, os rápidos avanços verificados na tecnologia *MS*, deram origem a sistemas *LC-MS/MS* de elevada sensibilidade e excelente seletividade/especificidade, em particular, com os detetores triplo quadrupolo (*QqQ*) operando no modo *MRM*, e o aparecimento dos novos analisadores do tipo *TOF* (do inglês *time-of-flight*) e *orbitrap*, que permitiram as medições de alta resolução e a determinação de massas exatas, que vieram trazer melhorias significativas nas análises realizadas a partir de amostras *DBS*, possibilitando a confirmação qualitativa e quantitativa com elevada precisão de substâncias presentes em baixas concentrações (inferiores a 1 ng/mL) a partir de pequenos volumes de amostras em muitos casos de apenas alguns microlitros. (Li et al., 2010; Otero-Fernández et al., 2013; Keevil et al., 2011; Meesters et al., 2013). Adicionalmente, a tecnologia *LC-MS/MS* permite, atualmente, não só a pesquisa ou triagem alvo de determinado grupo de substâncias (*target screening*), como também a triagem de verdadeiros desconhecidos (*general unknown screening*), o que em combinação com a análise direta das *DBS* pode representar uma nova e apelativa estratégia, uma vez que concilia um processo simples de amostragem com uma técnica altamente sensível e seletiva de detecção que permite a aquisição em simultâneo de diferentes experiências *MS/MS* aumentando a informação obtida numa única análise. (Déglon et al., 2012)

Pelos motivos anteriormente referidos, a tecnologia *LC-MS/MS*, nas suas mais diversas configurações, é atualmente a técnica analítica mais utilizada para a análise de amostras *DBS*, sendo presentemente uma metodologia bem estabelecida e em desenvolvimento crescente com aplicação diversa, nomeadamente na área da toxicologia forense.

Na presente dissertação a tecnologia utilizada para a análise a partir de amostras *DBS* das substâncias incluídas neste estudo foi a *UPLC-MS/MS* (do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*), equipamento que é formado por três componentes principais: o sistema de *UPLC*, a interface e o analisador *MS/MS* (**figura 3**).



**Figura 3** – Representação esquemática de um sistema UPLC-MS/MS (triplo quadrupolo).

### 1.2.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA PERFORMANCE (UPLC)

A cromatografia líquida (LC) consiste numa técnica de separação que utiliza uma fase móvel para separar os analitos que compõem uma determinada amostra através da sua migração diferencial ao longo de uma coluna cromatográfica, de acordo com os diferentes tipos de interações químicas e físicas dos analitos com as micropartículas que compõem o enchimento da coluna, designado por fase estacionária, e com a fase móvel. A maior ou menor retenção dos componentes da amostra depende da natureza do composto, da composição da fase estacionária e da fase móvel. O tempo que demora uma substância a ser eluída da coluna designa-se por tempo de retenção (TR), parâmetro característico de um composto para uma determinada fase móvel e estacionária, que é utilizado como critério de identificação. A fase móvel passa ao longo da coluna cromatográfica através da utilização de uma bomba de alta pressão. A utilização de pressão neste tipo de cromatografia aumenta a velocidade linear dos compostos e reduz a sua difusão dentro da coluna melhorando a resolução cromatográfica. Os solventes mais utilizados na composição da fase móvel, são: a água, o acetonitrilo e o metanol. A água, normalmente, contém tampões, ácidos ou bases, que ajudam na separação dos compostos. A eluição dos componentes da amostra da coluna pode ser realizada em condições isocráticas, ou seja, a composição da fase móvel não se altera durante o tempo em que decorre a análise, ou eluição em gradiente, situação em que existe a variação da composição da fase móvel. Através da otimização das condições de gradiente utilizadas, este tipo de eluição, normalmente, permite uma melhor separação dos componentes da amostra em função da diferença de afinidades das substâncias pela fase móvel *versus* fase estacionária.

Existem diferentes tipos de cromatografia líquida, dos quais se destacam, a cromatografia de fase normal (NP-HPLC, *Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography*) e a

cromatografia de fase reversa (*RP-HPLC*, *Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography*). A *NP-HPLC* foi o primeiro tipo de sistema de *HPLC* utilizado na área da química analítica e caracteriza-se por separar as substâncias de acordo com a sua polaridade. Esta técnica utiliza uma fase estacionária polar e uma fase móvel apolar, e é utilizada essencialmente quando a substância de interesse é muito polar. A força de ligação dos compostos à fase estacionária é tanto maior quanto maior a sua polaridade, aumentando o seu TR. A utilização de solventes mais polares na fase móvel diminui o TR dos compostos enquanto os solventes mais hidrofóbicos tendem a aumentar o seu TR. Na década de 1970, a *NP-HPLC* caiu em desuso, com o desenvolvimento da cromatografia de fase reversa, sendo esta, atualmente, o tipo de cromatografia mais vulgar e que foi utilizado neste trabalho.

Na *RP-HPLC*, vulgarmente designada simplesmente por *HPLC*, a fase estacionária é apolar e a fase móvel é de polaridade moderada. De entre as fases estacionárias mais comuns, destacam-se as formadas por partículas de sílica às quais se encontram ligadas cadeias alquila C18 ou C8. Na *RP-HPLC* o TR é maior para moléculas de natureza apolar em comparação com as moléculas polares, que eluem mais rapidamente. O TR dos compostos aumenta com a adição de um solvente polar à fase móvel e diminui com a introdução de solventes mais hidrofóbicos. A seleção dos constituintes da fase móvel é muito importante. Normalmente, num sistema de fase reversa a fase móvel inclui um tampão aquoso e um solvente orgânico, preferencialmente, acetonitrilo ou metanol. O tampão aquoso deve ser volátil, especialmente no caso do *LC-MS/MS*, preparado a partir de substâncias, como, por exemplo: o ácido fórmico, o ácido acético, o acetato de amónio, a amónia e o formato de amónio, uma vez que a utilização de tampões aquosos não voláteis, como, por exemplo, tampões fosfato, precipitam na fonte de iões, provocando o seu entupimento e consequente degradação da performance do equipamento. Por outro lado, a utilização de tampões com elevadas concentrações deve ser evitado, de modo a

prevenir a saturação da superfície das gotas formadas na interface do *LC-MS/MS*, com a consequente inibição da passagem dos analitos para a forma de um gás, conduzindo a uma diminuição da resposta analítica. Adicionalmente, é muito importante ajustar o pH da fase móvel, de modo a potenciar a ionização dos analitos de interesse, uma vez que a adição de uma pequena quantidade de um ácido volátil promove a ionização de compostos básicos, enquanto que a adição de uma base estimula a ionização dos compostos ácidos.

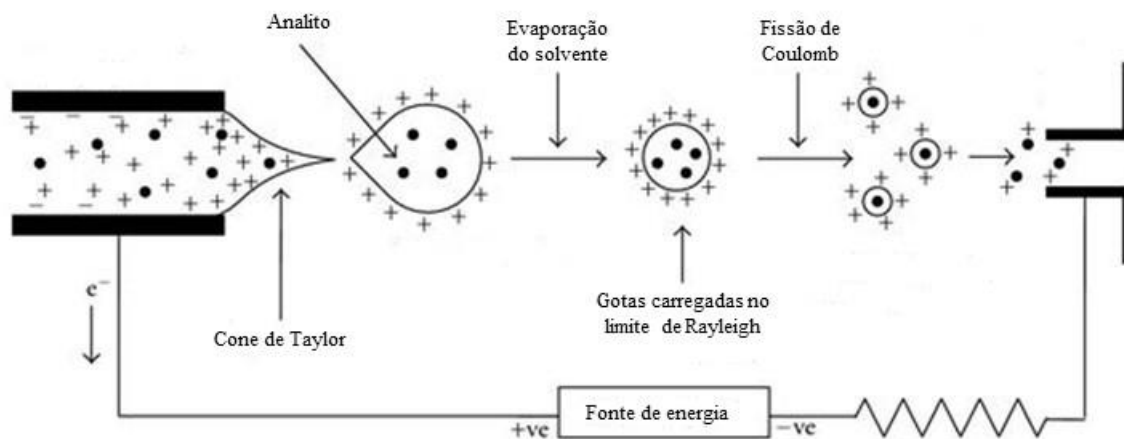
Na cromatografia, e de acordo com a equação de van Deemter, a eficiência aumenta com a utilização de partículas de menor diâmetro, porém a diminuição do tamanho das partículas do enchimento das colunas implica um aumento considerável da pressão exercida para promover a passagem da fase móvel através das colunas, sendo que a maioria dos sistemas de *HPLC* apenas podem operar até 400 bar. Por esse motivo, os sistemas convencionais apenas permitem a utilização de colunas com um diâmetro de partícula tipicamente entre 3 a 5  $\mu\text{m}$ , de modo a manter níveis de pressão aceitáveis. Ao longo dos últimos anos a cromatografia líquida tem sofrido uma grande evolução. Em 2004, a empresa Waters Corporation lançou no mercado um novo tipo de sistema de cromatografia de alta pressão designado por *UPLC* (marca registada que significa, *Ultra Performance Liquid Chromatography*), equipamento este que foi desenvolvido com o objetivo de permitir o uso de fluxos e pressões mais elevadas (até 1000 bar), possibilitando a utilização de fases estacionárias com partículas de diâmetro  $< 2 \mu\text{m}$ , o que se reflete num maior poder de resolução, maior eficiência, sensibilidade e velocidade de análise, comparativamente com os tradicionais sistemas de *HPLC*.

#### 1.2.2. INTERFACE (*ESI – ELECTROSPRAY IONIZATION*)

Para que os analitos possam ser introduzidos no espectrómetro de massa/massa, que se encontra sob alto vácuo, têm de ser previamente ionizados e o solvente proveniente do sistema de *UPLC*



deve ser eliminado. Este processo tem lugar na interface. Os tipos de interface mais comuns são: a *APCI* (*Atmospheric Pressure Chemical ionization*) e a *ESI* (*Electrospray Ionization*), sendo que este último é o tipo de ionização mais utilizado, nomeadamente, na área da toxicologia forense e para a análise das substâncias incluídas neste estudo. Na *ESI*, o eluente proveniente do cromatógrafo entra na sonda através de um capilar metálico ao qual é aplicado uma alta voltagem (tipicamente entre 1 a 5 Kv), que leva à produção de um aerosol fino formado por gotículas carregadas de cargas elétricas, as quais saem da sonda *ESI*. Para auxiliar na evaporação do solvente, e consequente formação dos analitos sob a forma de um gás ionizado, é aplicado co-axialmente um gás de dessolvatação (o azoto) a uma determinada temperatura (normalmente, entre 350 a 450°C). À medida que o solvente evapora, o tamanho das gotículas diminui, e a repulsão eletroestática entre as cargas aumenta. O solvente evapora até que a tensão superficial das gotículas atinja o denominado limite de Rayleigh. Neste ponto, as gotículas começam a deformar-se à medida que a repulsão eletroestática das cargas, nas gotículas progressivamente de menor tamanho, fica mais forte do que a tensão superficial que as mantém intactas. Nesta altura, as gotículas sofrem a denominada fissão de Coulomb, que consiste na sua “explosão” formando outras de menor tamanho. As novas gotículas são, sucessivamente, submetidas de novo ao processo de dessolvatação e fissão de Coulomb, formando-se progressivamente gotículas cada vez mais pequenas, até se obter um gás formado pelos analitos ionizados, que são atraídos para a entrada do espectrómetro de massa devido à alta tensão de carga oposta aplicada à entrada do analisador de massas. **(figura 4)**



**Figura 4** – Representação esquemática do processo de ionização por Electrospray (ESI).

A ESI é considerada uma técnica de ionização suave, uma vez que se verifica uma fragmentação muito reduzida das moléculas na fonte de ionização. Os iões obtidos são essencialmente iões moleculares (ou mais corretamente, iões pseudo-moleculares), formados pela adição de um hidrogénio  $[M + H]^+$  ou pela formação de um aducto com outro catião, como seja, por exemplo, o ião sódio  $[M + Na]^+$ , ou pela remoção de um hidrogénio  $[M - H]^-$ , dependendo se o tipo de ionização selecionado for a ionização positiva ou negativa, respetivamente. Se por um lado, esta característica pode ser uma vantagem, uma vez que se observa sempre o ião molecular correspondente aos analitos, por outro, obtém-se muito pouca informação estrutural a partir do espectro de massa formado apenas por um ião. Esta desvantagem é ultrapassada através da combinação com a espectrometria de massa em *tandem* (ESI-MS/MS).

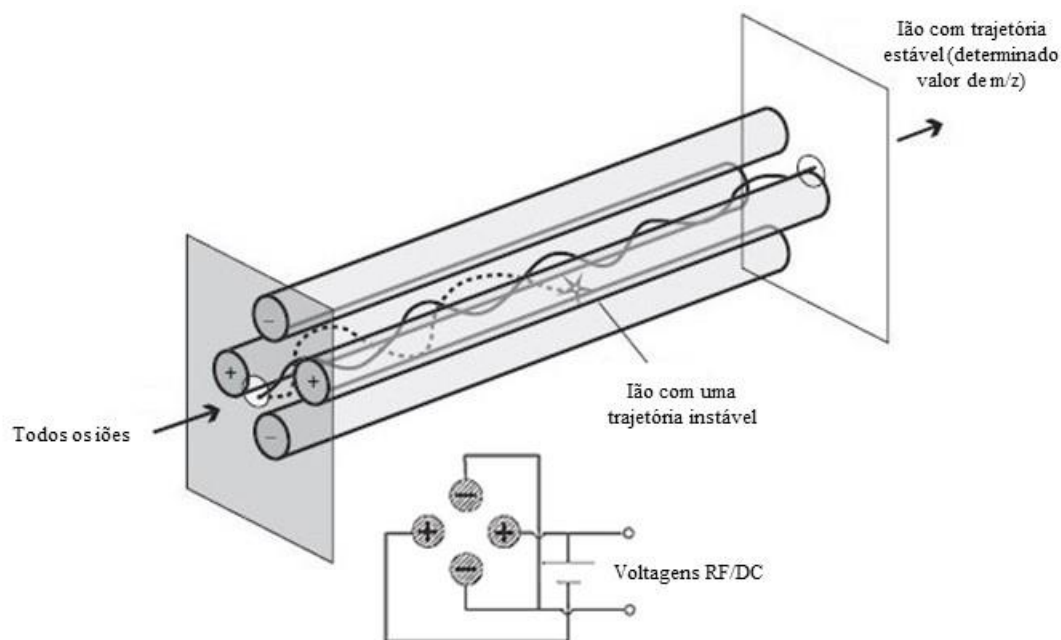
### 1.2.3. ESPECTRÓMETRO DE MASSA/MASSA - TRIPLO QUADRUPOLO (TQD)

A espectrometria de massa é uma poderosa ferramenta analítica que permite identificar as moléculas de interesse através da medição da relação massa/carga ( $m/z$ ) dos seus iões, quantificar através da sua abundância, e auxiliar na elucidação estrutural das moléculas. Na espectrometria de massa, qualquer que seja a técnica utilizada, o objetivo é sempre o de alcançar

a ionização das moléculas em fase gasosa e proceder à sua separação e deteção. Para tal, todos os tipos de espectrómetros de massa têm a mesma configuração básica, que consiste: numa fonte de ionização (onde os componentes da amostra são convertidos em iões); um analisador de massas (que separa os iões de acordo com a sua relação  $m/z$ ); um detetor (que converte a corrente de iões em sinais elétricos e amplifica o sinal); e um computador que recebe o sinal e processa os dados, sendo que o analisador e o detetor operam sob condições de alto vácuo **(figura 3)**. O resultado final do sinal que é detetado e registado pelo sistema de dados, é um espectro de massa que é representado, em duas dimensões, pela intensidade do sinal (no eixo das ordenadas), que reflete diretamente a abundância das espécies iónicas, *versus* a relação  $m/z$  (no eixo das abcissas).

Existem vários tipos de analisadores de massa, diferenciados de acordo com o princípio de medição da razão  $m/z$  dos iões, nomeadamente, o analisador de quadrupolo, de captura de iões (*ion trap*), de tempo de voo, vulgarmente designado por *TOF (time-of-flight)* e de setor magnético, sendo que o quadrupolo é o mais comum na técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, e o tipo de analisador utilizado neste estudo. Os analisadores do tipo quadrupolo separam os iões de acordo com a sua razão  $m/z$ , através da transmissão dos iões e do controlo da sua trajetória através de um campo eletrodinâmico ou magnético. Este campo é gerado por quatro barras dispostas paralelamente, arranjadas em dois pares opostos, aos quais é aplicado um potencial elétrico idêntico mas de carga oposta alternadamente, formado por duas correntes elétricas, a corrente contínua (*DC*, do inglês *direct current*) e a corrente alternada ou de radiofrequência (*RF*). A aplicação destas duas voltagens afeta a trajetória dos iões. Fazendo variar as voltagens aplicadas, possibilita que o quadrupolo funcione como um filtro, em que somente os iões com uma determinada razão  $m/z$  conseguem

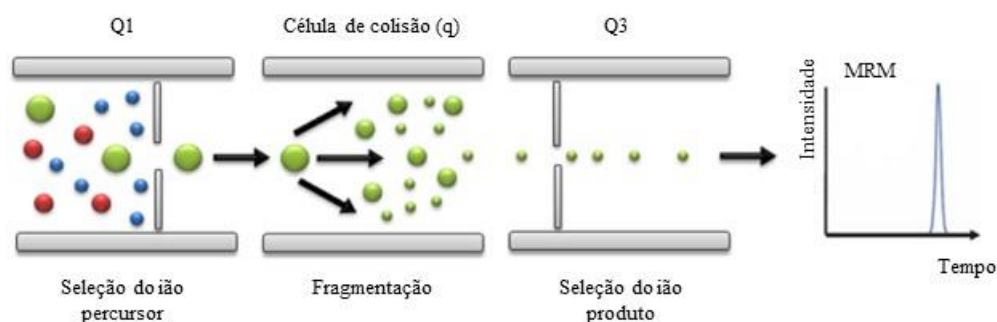
atravessar no centro do quadrupolo até ao detetor, enquanto que os outros iões são desviados da trajetória central. (figura 5)



**Figura 5** – Representação esquemática do funcionamento de um quadrupolo.

Por forma a aumentar a seletividade e sensibilidade dos sistemas *MS* associados à técnica de cromatografia líquida, são vulgarmente utilizados mais de um analisador de massa em sequência, designados por sistemas de espectrometria de massa/massa (*MS/MS*) ou de massa em *tandem* que permitem a indução da fragmentação dos iões moleculares e a análise dos fragmentos resultantes, numa série de sucessivos e distintos passos que compõem a análise da amostra. No presente trabalho, foi utilizado um equipamento habitualmente designado por, triplo quadrupolo (QqQ), onde o analisador é formado por dois quadrupolos em série (Q1 e Q3) com uma célula de colisão (q2) entre eles, que funciona como uma célula para a dissociação ativada por colisão dos iões moleculares. Cada um dos dois quadrupolos (Q1 e Q3), funcionam como filtros de massa, sendo controlados por aplicação de uma corrente contínua (DC) e de radiofrequência (RF), enquanto que a célula de colisão é apenas submetida ao potencial de RF.

A análise neste tipo de sistemas envolve normalmente três passos. Numa primeira fase, no primeiro filtro de massas (Q1), são selecionados os iões precursores (assim designados por se tratarem dos iões a partir dos quais são formados outros iões). Posteriormente, na célula de colisão (q2), os iões precursores são fragmentados por colisão com as moléculas de um gás inerte (normalmente, azoto, hélio ou árgon). Ao sair da célula de colisão, os iões produto resultantes da fragmentação deslocam-se para o segundo filtro de massa (Q3), onde é feita a sua análise/seleção de acordo com determinadas razões  $m/z$ , seguindo depois para o detetor (figura 6).



**Figura 6** – Representação esquemática de um analisador triplo quadrupolo no modo MRM.

Os analisadores triplo quadrupolo podem funcionar em diferentes modos de aquisição, sendo que o mais utilizado para a identificação e quantificação dos analitos de interesse devido à elevada sensibilidade e seletividade que o caracteriza, é o modo *MRM* (*Multiple Reaction Monitoring*), também designado por *SRM* (*Selected Reaction Monitoring*), pelo que, foi este o modo de aquisição utilizado para a realização deste trabalho. Na aquisição em *MRM* os analisadores Q1 e Q3 funcionam no modo estático, ou seja, são estabelecidos determinados valores de *DC* e de *RF* que permitem a seleção de um ião precursor com uma razão  $m/z$  específica no Q1, que sequencialmente sofre fragmentação na célula de colisão (q2), e por último, no Q3 é selecionado um ião produto resultante dessa fragmentação com uma

determinada razão  $m/z$  (**figura 6**). O resultado da aquisição em *MRM* são pares de iões formados por um ião precursor ao qual corresponde o respetivo ião produto, designado vulgarmente por transição. Normalmente, no modo de aquisição por *MRM* são selecionados, sempre que possível, pelo menos duas transições ou pares de iões característicos, sendo que o ião produto mais abundante é normalmente utilizado para a quantificação e o segundo ião produto é considerado o ião qualificador ou diagnóstico que permite a confirmação qualitativa do analito de interesse.

### **1.3. APLICAÇÕES DAS *DBS* NA ÁREA DA TOXICOLOGIA FORENSE**

A utilização das *DBS* pode ser encarada de diferentes perspetivas. Por um lado, as *DBS* podem ser consideradas apenas como um procedimento de preparação das amostras simples e menos dispendioso, uma vez que o papel de filtro tem a capacidade de reter diversos componentes da matriz biológica, podendo significar a simplificação do procedimento de extração, permitindo inclusive a sua automatização. (Déglon et al., 2012; Mercolini et al., 2010; Versace et al., 2013) Por outro lado, as *DBS* podem representar uma matriz útil na área da toxicologia clínica e forense, uma vez que se trata de uma técnica de amostragem simples, pouco invasiva, rápida e económica (em contraste com as amostras de sangue obtidas por venopunção), e fornecem informação sobre o estado de influência de um indivíduo ao contrário da urina, fluido oral e cabelo. (Versace et al., 2013) Uma técnica de amostragem rápida, como é o caso das *DBS*, é particularmente importante nos casos em que o tempo de vida médio de uma substância é curto, como sucede, por exemplo, no caso da cocaína, heroína (e o seu metabolito, a 6-monoacetilmorfina ou 6-MAM) e o *GHB*. No caso da cocaína, o consumo pode ser demonstrado através da presença do seu metabolito, a benzoilecgonina. Contudo, o mesmo já não acontece com o consumo de heroína que não pode ser implícito, simplesmente pelo facto de se confirmar

a presença do seu produto de hidrólise, a morfina. (Sosnoff et al., 1996; Alfazil e Anderson, 2008; Garcia Boy et al., 2008; Mercolini et al., 2010; Ingels et al., 2010; Ingels et al., 2011) Contudo, é importante ter em atenção que nos casos em que a informação toxicológica seja urgente, nomeadamente no diagnóstico atempado para a decisão sobre o tratamento a administrar a um paciente, a técnica *DBS* pode não ser a mais adequada, uma vez que envolve necessariamente um passo de secagem mínimo das manchas de sangue de 2 horas. Quando um tempo de resposta rápido não é um requisito essencial, a utilização das *DBS*, tanto como técnica de amostragem como de procedimento de preparação das amostras, pode ser útil para as análises de triagem, confirmação e/ou quantificação. Neste contexto, deve-se referir, ainda, que as *DBS* podem igualmente secar durante o seu transporte desde o local da colheita até ao laboratório, tendo o cuidado de colocar o papel de filtro com as manchas de sangue numa caixa ou bolsa contendo um agente excicante, e evitando o contacto das manchas com outras superfícies. Deste modo, em muitos casos não se verificará o atraso na receção das amostras no laboratório, devido ao tempo de secagem das manchas de sangue. (Sadones et al., 2014)

Nos casos de condução sob a influência de drogas ou *DUID* (*Driving Under the Influence of Drugs*), o sangue é a matriz biológica de eleição para a confirmação e quantificação das substâncias presentes em situações de suspeita de estado de influência ou intoxicação, envolvendo, normalmente, a necessidade de recorrer a pessoal médico autorizado para proceder à colheita das amostras, o que muitas vezes pode implicar um tempo de espera demasiado longo entre o momento da ocorrência e o da colheita, e consequentemente, as concentrações obtidas a partir destas, não refletem com exatidão a concentração presente no sangue no momento da condução. (Jantos et al., 2011) Por este motivo, em muitos países, a utilização de dispositivos para o teste de drogas no local a partir da saliva ou fluido oral, está descrito na legislação e tem-se tornado na matriz biológica de escolha para a triagem e confirmação no âmbito *DUID* em

muitos destes casos. (Huestis et al., 2011) Contudo, esta matriz apresenta alguns inconvenientes, nomeadamente, a existência de alguma controvérsia no que diz respeito às concentrações obtidas a partir do fluido oral e se estas refletem sempre as concentrações presentes no sangue, aliado ao facto de não se poder excluir a possibilidade de contaminação no caso da administração oral das substâncias, para além de ser possível a sua adulteração através, por exemplo, da lavagem da boca previamente à colheita da amostra. (Bosker e Huestis, 2009; Huestis et al., 2011) Tendo em conta as vantagens apresentadas pela técnica de amostragem *DBS*, nomeadamente, o facto de se tratar de um método simples, rápido e pouco invasivo de colheita, que, em princípio, pode ser realizada por pessoal não-especializado, permitindo a obtenção de uma amostra de sangue no local e hora da ocorrência, faz das *DBS* uma alternativa interessante para a determinação das drogas nos casos *DUID*. Contudo, é importante ter em atenção algumas questões relacionadas com a utilização desta técnica. Em primeiro lugar, o facto da colheita das amostras *DBS* também poder ter um risco de contaminação associado, nomeadamente, quando a colheita de sangue é feita por punção no dedo de um indivíduo que manipulou a droga sem necessariamente a ter ingerido, podendo-se obter vestígios da substância durante a análise das *DBS*, pelo que é muito importante proceder previamente à descontaminação do local da colheita da amostra, e por outro lado, sempre que possível, fazer a identificação dos metabolitos, uma vez que, por exemplo, quando a partir da análise das *DBS* apenas se confirma a presença de cocaína e não é detetada a benzoílecgonina, muito provavelmente a cocaína resulta de uma contaminação externa. Em segundo lugar, é importante ter em atenção, que apesar de já existirem estudos comparativos da análise de *DBS* preparadas a partir de amostras de sangue venoso colhidas no contexto *DUID*, com os resultados obtidos a partir dos métodos analíticos tradicionais, não existem ainda estudos comparativos que incluam as verdadeiras amostras *DBS* obtidas a partir de sangue capilar



colhido no âmbito *DUID*. (Déglon et al., 2012a; Sausseureau et al., 2012; Jantos et al., 2011a; Sadones et al., 2014) Por isso, é muito importante, que no caso da utilização de *DBS* de sangue capilar, seja demonstrada a equivalência entre as concentrações obtidas a partir destas e do correspondente sangue venoso, para os analitos de interesse. Em terceiro lugar, no caso das colheitas realizadas *in loco* deve-se ter o cuidado de deixar secar o papel de filtro de forma adequada, uma vez que a estabilidade dos analitos pode depender do tempo e das condições de secagem. (Stove et al., 2012) Por último, importa referir que atualmente ainda existe o entrave relacionado com a legislação, que na maior parte dos países não permite a colheita de amostras *DBS* a outrém por pessoal não-médico. (Jantos et al., 2011; Stove et al., 2012)

A técnica de amostragem *DBS* também pode ser útil no controlo do estado de abstinência e/ou do consumo de medicação de substituição, em indivíduos com problemas de dependência de drogas de abuso e/ou álcool (através da determinação do etilglucuronido, etilsulfato ou fosfatidiletanol). Neste caso, a utilização das *DBS*, apesar de oferecerem uma menor janela de deteção, podem representar, mesmo assim, uma alternativa aos testes atualmente realizados a partir da urina. Ao contrário desta, a colheita das amostras *DBS* não é dificultada por problemas de invasão da privacidade relacionados com a diferença de género, o que muitas vezes pode significar uma colheita não supervisionada, possibilitando a adulteração da amostra. Adicionalmente, o baixo risco de infeção por agentes patogénicos associado ao manuseamento das amostras *DBS*, representa uma vantagem adicional, tendo em conta a elevada prevalência de infeções virais (por exemplo, com o vírus da hepatite e do VIH-SIDA) em indivíduos com historial de abuso de drogas intravenosas. (Stove et al., 2012)

Por outro lado, o facto das *DBS* serem uma matriz seca, com a consequente redução da atividade enzimática e da degradação bacteriana, significa uma forma de estabilização para muitas

substâncias, o que pode representar uma vantagem com aplicação prática, como forma de armazenamento das amostras de sangue por longos períodos de tempo. É o caso, por exemplo, da estabilização das drogas com grupos éster na sua estrutura química (como, por exemplo, a cocaína e 6-MAM) através da redução das reações de hidrólise nas *DBS*, ao contrário do que se passa com as amostras tradicionais de sangue total, situação particularmente importante no caso da 6-MAM, uma vez que, como foi referido anteriormente, a presença desta é que permite demonstrar o consumo inequívoco da heroína, o que não pode ser feito através da confirmação da presença apenas de morfina. (Alfazil e Anderson, 2008; Garcia Boy et al., 2008) Por outro lado, as *DBS* podem igualmente ajudar a ultrapassar o problema relacionado com a formação *ex vivo* de um determinado composto. É o caso, por exemplo, do *GHB*, cuja formação *ex vivo* em amostras de sangue total tem sido reportado (Zörntlein et al., 2012), enquanto que o armazenamento das amostras sob a forma de *DBS* à temperatura ambiente por períodos relativamente longos de tempo (até 6 meses) não apresentou alterações significativas, de acordo com o trabalho publicado por Ingels et al.. (Ingels et al., 2011) Isto, permite-nos concluir, que nestes casos, a técnica de *DBS* apresenta vantagens que podem ajudar a ultrapassar os inconvenientes associados às amostras clássicas de sangue venoso, resultando numa maior confiança nos resultados obtidos.

No que diz respeito às amostras *post-mortem*, não existem descritos atualmente na literatura muitos trabalhos que utilizem as *DBS* na sua análise. Apesar da utilização das *DBS* como uma técnica de amostragem, com as vantagens a esta associadas, não poder ser obviamente utilizada, neste caso, o facto de poderem representar um incremento significativo na estabilidade para alguns analitos e a possibilidade de poder realizar uma análise a partir de um volume muito reduzido de amostra, são vantagens que podem ainda assim justificar a sua utilização na análise de amostras *post-mortem*. Contudo, é importante ter presente que o sangue *post-mortem*, muitas

vezes se encontra hemolisado ou coagulado, significando uma distribuição diferente do sangue no papel de filtro. De facto, as *DBS* obtidas a partir de sangue hemolisado diferem estruturalmente das obtidas a partir de sangue fresco, o que, dependendo do analito, pode ou não resultar na distorção dos resultados, situação que deve ser avaliada individualmente. (Abu-Rabie e Spooner, 2010)

Para um laboratório de toxicologia forense, as *DBS* podem ainda representar uma forma de armazenamento mais económica, mais simples e menos exigente em termos de espaço, de pequenos volumes de amostra de casos encerrados, quando todas as outras evidências são para ser descartadas. Deste modo, quando por uma razão ou outra, seja necessário reabrir um processo, existe pelo menos algum material disponível que pode permitir uma nova análise. Evidentemente, esta hipótese só é possível para os analitos que se mantêm estáveis por longos períodos de tempos nas *DBS*. (Stove et al., 2012)

#### **1.4. DROGAS DE ABUSO**

O termo “droga” (do inglês *drug*) é um nome genérico dado a qualquer substância natural, semi-sintética ou sintética, que ao ser introduzida no organismo provoca alterações físicas e psíquicas de maneira transitória ou permanente. Nas áreas da medicina e da farmacologia, “droga” é qualquer substância que previne ou cura doenças ao produzir alterações fisiológicas nos organismos. No sentido corrente, o termo droga (em português) refere-se em geral às substâncias ilícitas que afetam o sistema nervoso central e modificam as sensações e o comportamento do indivíduo, provocando alucinações ou distúrbios nas funções motoras, cerebrais ou na percepção, capazes de causar dependência química ou psicológica. Este tipo de drogas é utilizado com fins recreativos, podendo as drogas ser consumidas de forma experimental, ocasional, habitual ou dependente, sendo que, com frequência, o consumo é feito

de forma excessiva, persistente e de um modo mais ou menos compulsivo, pelo que vulgarmente são designadas por drogas de abuso.

As drogas, de uma forma geral, são classificadas de acordo com os efeitos farmacológicos que provocam, ou seja, a forma como atuam sobre o cérebro, dividindo-se em três grupos: depressoras, estimulantes e alucinógenas. As drogas depressoras do sistema nervoso central, tais como o álcool e os opiáceos, diminuem o nível de atividade no cérebro, deixando o organismo mais lento. As drogas estimulantes aceleram o funcionamento do cérebro, aumentando os níveis de atividades motora e cognitiva, reforçam a vigilância, o estado de alerta e a atenção, e algumas vezes têm um efeito euforizante. Fazem parte deste grupo as anfetaminas e a cocaína. Por último, as drogas alucinógenas ou perturbadoras causam, frequentemente, alterações da percepção, sobretudo ao nível da visão. Não diminuem, nem aumentam a atividade cerebral, mas alteram a maneira como funciona o cérebro. São exemplos, o cannabis, LSD e o ecstasy.

A análise de drogas de abuso a partir de diferentes matrizes biológicas no âmbito da toxicologia forense é extremamente útil e importante. Várias são as metodologias analíticas desenvolvidas para a confirmação e quantificação de drogas de abuso nas mais diversas matrizes biológicas, sendo que as mais comuns são: o sangue, a urina, e o cabelo. Cada uma delas com as suas particularidades, vantagens e inconvenientes, facultando diferente tipo de informação. Uma das diferenças entre espécimes é a “janela” de deteção. Nas amostras de sangue, este tempo é muito curto, uma vez que a maior parte das drogas de abuso desaparece ao fim de 8 a 24 h após o seu consumo, pelo que esta matriz pode dar uma noção aproximada do tempo decorrido desde a última administração, constituindo, a matriz de eleição quando a diminuição da performance e

a alteração do comportamento tem de ser estabelecido ou quando é necessário verificar se um indivíduo poderia estar sob a influência de drogas num determinado momento.

No presente estudo sobre a aplicação das *DBS* na área da toxicologia forense, foi selecionado um grupo representativo das principais drogas de abuso, que incluiu: anfetaminas, cocaína (e o metabolito, benzoilecgonina), metadona (e o metabolito, EDDP) e opiáceos. Infelizmente, não foi possível incluir o cannabis, a droga de abuso mais consumida em todo o mundo, uma vez que o volume reduzido de amostra utilizado na técnica de amostragem *DBS*, aliado ao equipamento *LC-MS/MS* disponível atualmente no laboratório não permitir atingir os valores mínimos de concentração exigidos na análise das principais substâncias ativas do cannabis, nomeadamente, o THC e o 11-OH-THC.

#### 1.4.1. ANFETAMINAS

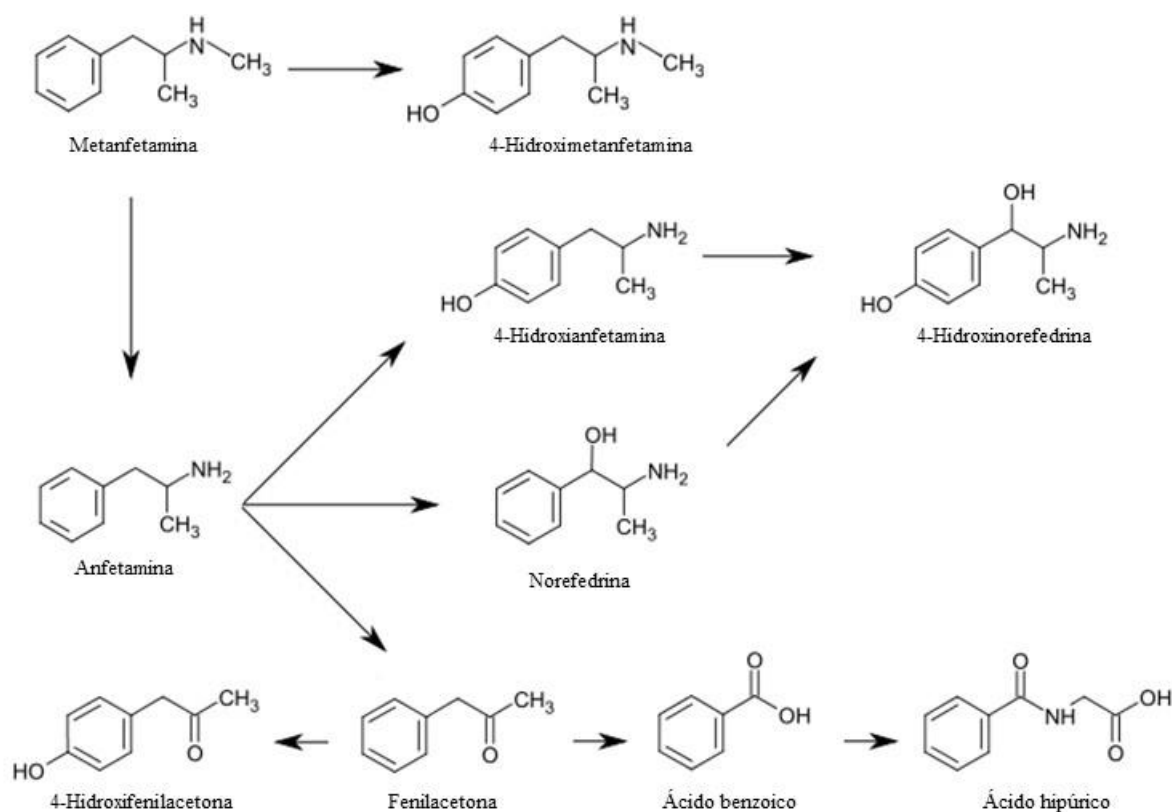
As anfetaminas são compostos sintéticos, simpatomiméticos baseados na estrutura química da feniletilamina (uma substância de origem natural), que possuem atividade estimulante central e periférica. As anfetaminas são utilizadas no tratamento da narcolepsia, da hipotensão, da síndrome da hiperatividade com défice de atenção nas crianças, e da obesidade (atuando ao nível do hipotálamo, nos centros de controlo do apetite). Recreativamente, a sua utilização abusiva deve-se essencialmente aos seus efeitos estimulantes e euforizantes, com o objetivo de aumentar o estado de alerta, aliviar a fadiga e diminuir a inibição ajudando a quebrar as barreiras ao nível da comunicação. Adicionalmente, são usadas no controlo do peso e no tratamento da depressão ligeira. A anfetamina é a substância precursora deste importante grupo de estimuladores do sistema nervoso central (SNC), mas muitos outros derivados já foram sintetizados e podem ser facilmente encontrados em vários medicamentos, como é o caso do clobenzorex, da efedrina, do fenproporex, da selegilina, entre outros. Além dessas, existem as

anfetaminas de uso ilegal, designadamente, a metanfetamina, a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e a 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA). Os derivados anfetamínicos podem atuar de diversas maneiras, agindo principalmente como agonistas de ação indireta das sinapses noradrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas. Estas ações resultam da inibição da recaptação dos neurotransmissores e da inibição da enzima monoaminoxidase (MAO).

O abuso reiterado da anfetamina e metanfetamina podem resultar numa redução dos níveis de dopamina a longo prazo, além da perda de transportadores para esse neurotransmissor. A metanfetamina possui ação central mais potente que a anfetamina, exibindo uma maior toxicidade ao nível do SNC. A exposição crónica à metanfetamina provoca o aparecimento de sintomas semelhantes aos descritos na doença de Parkinson, nomeadamente, a descoordenação motora grave e a diminuição da capacidade de locomoção, para além de severas alterações funcionais e estruturais associadas à aprendizagem e à memória. Adicionalmente, a exposição longa a estas substâncias pode provocar ansiedade, confusão, insónia, alterações de humor e comportamento violento, para além de distúrbios psicóticos, nomeadamente, alucinações visuais, auditivas e ilusões. (Baselt, 2002; Matsumoto et al., 2002; Volkow et al., 2001a e 2001b)

Estas substâncias estruturalmente existem sob a forma de isómeros e estereoisómeros, sendo que a forma S(+)- ou *D*- possui, aproximadamente, três a quatro vezes mais atividade ao nível do SNC do que o isómero (ou enantiómero) R(-)- ou *L*-. Também é importante observar que as formas enantioméricas *D*- e *L*- não se diferenciam apenas na sua atividade farmacológica, mas também na sua atividade farmacocinética, uma vez que o *D*-enantiómero, tanto da anfetamina como na metanfetamina, é metabolizado mais rapidamente do que o *L*-enantiómero (Jurado, 2013). A metabolização da metanfetamina realiza-se principalmente ao nível do fígado através

do citocromo P450 (CYP2D6). As principais vias metabólicas são a hidroxilação aromática, que dá origem à 4-hidroximetanfetamina, e a N-desalquilação para formar a anfetamina. Outros metabolitos, presentes em menor quantidade, incluem a norefedrina, a 4-hidroxianfetamina, a 4-hidroxinorefedrina, e a fenilacetona e o ácido benzoico (principais metabolitos da anfetamina) (**figura 7**).



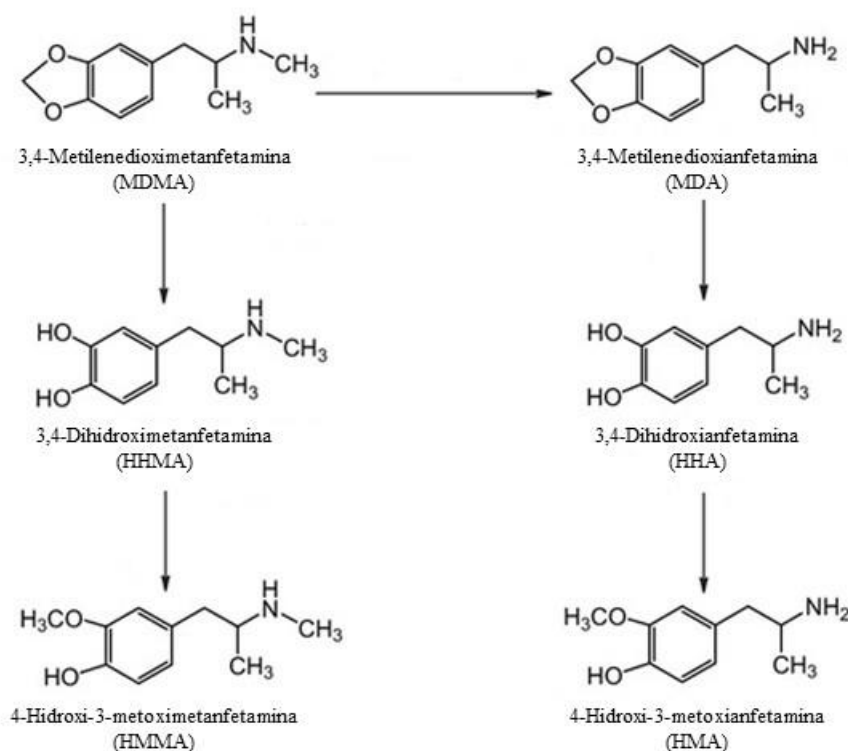
**Figura 7** – Principais vias metabólicas da metanfetamina e da anfetamina.

O MDMA, popularmente conhecido como *ecstasy*, surgiu no início do século XX e tem sido, de entre as substâncias derivadas da anfetamina, a mais utilizada de forma ilícita com fins recreativos. Os efeitos do MDMA, em doses normais, duram aproximadamente 3 a 5 horas, consistindo em efeitos moderados do SNC que se traduzem em euforia, relaxamento, diminuição da ansiedade, incremento do sentimento de empatia e do desejo de contacto com outras pessoas e maior facilidade de comunicação. A sua utilização surge, mais frequentemente,

associada a festas de música eletrônica, conhecidas vulgarmente por *raves*. Para além dos efeitos procurados pelos consumidores, podem surgir outros efeitos não desejados, nomeadamente, as alucinações visuais, confusão, agitação, aumento da frequência cardíaca, náuseas e desmaios, e reações mais graves, como a hipertensão, hipertermia e/ou a hiponatremia (normalmente devido ao consumo excessivo de água, comum à ingestão deste tipo de substâncias), que, por sua vez, podem conduzir a situações de edema cerebral, apoplexia, falências no sistema cardiovascular, dos rins e do fígado, ao coma e eventualmente à morte. (Kolbrich et al., 2008)

O MDMA também é um composto quiral utilizado normalmente como uma mistura racémica dos dois enantiómeros. Alguns estudos apontam para uma maior atividade alucinogénica por parte do *L*-MDMA, enquanto que o *D*- possui um maior efeito estimulante (Kalant, 2001). Os enantiómeros do MDMA também diferem quanto à metabolização. A enzima CYP2D6 também é enantioselectiva para a forma *D*-, catalisando as desalquilações no metabolismo do MDMA, responsável pela conversão em MDA, preferencialmente na sua forma *D*-, substância que apresenta maior neurotoxicidade do que o seu precursor, o MDMA. (De La Torre et al., 2004; Pizarro et al., 2003) O MDA sofre por sua vez metabolização dando origem ao 3,4-dihidroxianfetamina (HHA) e ao 3-hidroxi-4-metoxianfetamina (HMA). Adicionalmente, o MDMA pode dar origem aos metabolitos, 3,4-dihidroximetanfetamina (HHMA) e 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) (**figura 8**), sendo que, os analitos detetados no sangue são essencialmente o MDMA e o MDA, com concentrações de MDA tipicamente correspondentes a 5 – 10% da concentração de MDMA, pelo que, valores superiores do rácio MDA:MDMA normalmente significam a co-administração de MDA. (Jurado, 2013)





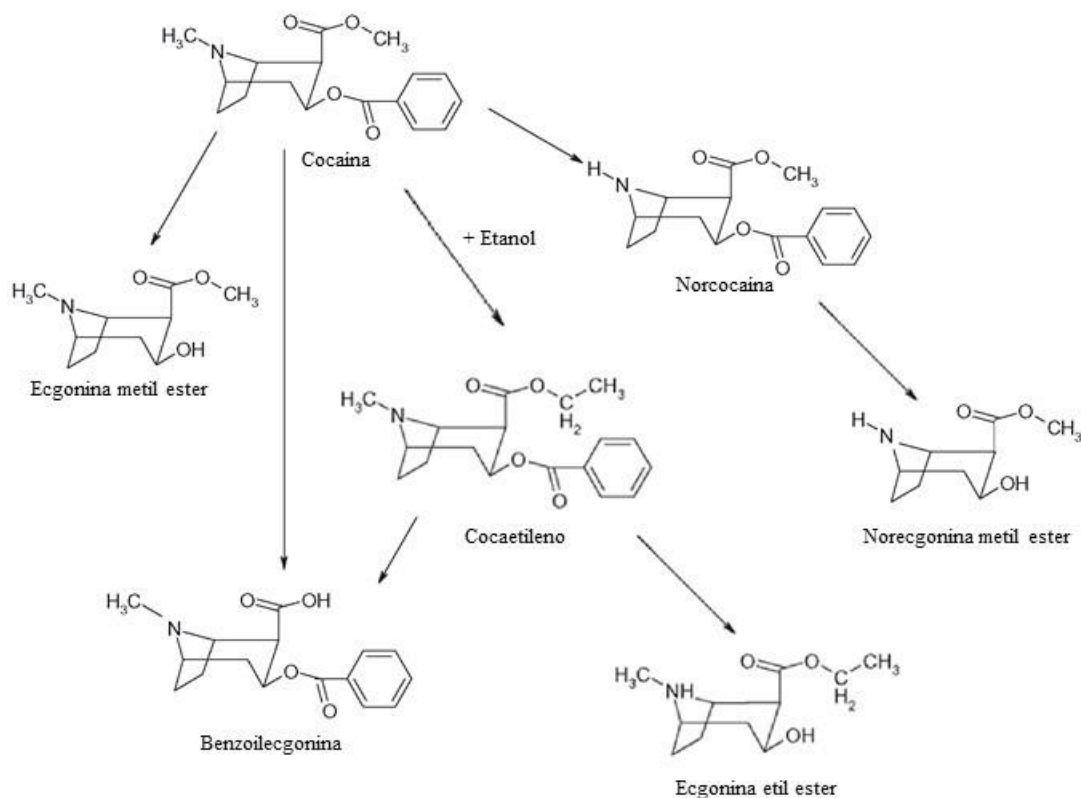
**Figura 8** – Principais vias metabólicas do MDMA.

#### 1.4.2. COCAÍNA

A cocaína é um dos estimulantes mais potentes do SNC de origem natural. Trata-se de um alcalóide extraído a partir das folhas de uma espécie vegetal, o arbusto da *coca*, *Erythroxylum coca*, que cresce principalmente na parte norte dos Andes sul-americanos e em menor quantidade na Índia, África e Indonésia. A cocaína pode ser consumida de várias formas, a partir de diferentes tipos de preparações. As folhas de coca podem ser mascaradas ou ingeridas como chá de coca, por outro lado, a pasta base de coca que é obtida nas primeiras fases de preparação da cocaína pura e que possui muitas impurezas tóxicas, pode ser misturada com tabaco e cannabis. Mas o modo mais comum é através da inalação da droga, sob a forma de cloridrato de cocaína (produto da refinação da pasta base), que normalmente se apresenta sob a forma de um pó branco e fino. Alguns consumidores chegam a dissolver a cocaína em água e

injetar diretamente na corrente sanguínea (via endovenosa), o que eleva consideravelmente o risco de uma paragem cardíaca, causada por uma *overdose*. Por outro lado, a cocaína pode ser consumida sob a forma de *crack*, que consiste na cocaína básica, a sua forma livre, que é obtida da mistura da pasta com bicarbonato de sódio ou amónia. O *crack* é assim denominado pelo som característico dos estalidos que produz ao ser fumado, e é conhecido nos Estados Unidos, vulgarmente, como a “cocaína dos pobres e mendigos” por ser muito mais barata e fácil de consumir, produzindo maior prazer e efeitos mais pronunciados, mas de menor duração em comparação com a cocaína salina. (Isenschmid, 2002)

A cocaína é um inibidor da enzima MAO, da recaptação dos neurotransmissores (dopamina, noradrenalina e serotonina) e estimulante da sua libertação. Os efeitos obtidos são similares aos das anfetaminas, mas mais intensos e menos prolongados. Os principais efeitos desencadeados pela cocaína são: sensação de intensa euforia e onipotência, aumento da autoconfiança, estado de excitação, hiperatividade, insónia, falta de apetite, dilatação das pupilas (midríase) e aumento da temperatura corporal. Para além destes, podem surgir efeitos indesejáveis, como sejam, a paranóia, as alucinações e a disforia. A estimulação a nível central seguida de depressão constitui o principal motivo para a utilização abusiva e crónica da cocaína. No caso do consumo por via nasal, observa-se o ressecamento das narinas gerada pela contração das artérias que irrigam a cavidade nasal, podendo culminar com a necrose dessa área, com o desenvolvimento de ulcerações ou perfurações no septo nasal, no caso dos utilizadores crónicos. A cocaína também produz efeitos cardiovasculares, nomeadamente, hipertensão, taquicardia e palpitações, podendo chegar a produzir paragem cardíaca. A morte por consumo excessivo da droga, também pode resultar da diminuição da atividade dos centros cerebrais que controlam a respiração. (Isenschmid, 2002)



**Figura 9 – Principais vias metabólicas da cocaína.**

Quanto à metabolização (**figura 9**), as principais vias metabólicas são a hidrólise pela enzima colinesterase, que converte a cocaína no éster metílico da ecgonina. A cocaína sofre igualmente a hidrólise hepática mediada pela carboxilesterase, formando a benzoilecgonina, e por último também pode, através de um processo de N-desalquilação, dar origem à norcocaína, um metabolito ativo muito potente, que, no entanto, surge apenas em pequenas concentrações. Tanto o éster metílico da ecgonina como a benzoilecgonina são metabolitos inativos. Por outro lado, a cocaína é muitas vezes consumida juntamente com o álcool. A sua combinação provoca o aumento dos níveis plasmáticos da cocaína e norcocaína, reduz as concentrações de benzoilecgonina e resulta na formação de um novo metabolito ativo, o cocaetileno. Este apresenta propriedades semelhantes à cocaína, sendo que os seus efeitos são aparentemente mais intensos e duradouros do que a cocaína utilizada isoladamente. Alguns estudos referem

mesmo que o cocaetileno pode ter maior toxicidade cardiovascular. (Harris et al., 2003; Isenschmid, 2002; McCance-Katz et al., 1993) Uma vez que o metabolismo da cocaína é bastante rápido, a confirmação do seu consumo é normalmente obtido a partir da detecção do seu principal metabolito, a benzoilecgonina.

#### 1.4.3. OPIÁCEOS

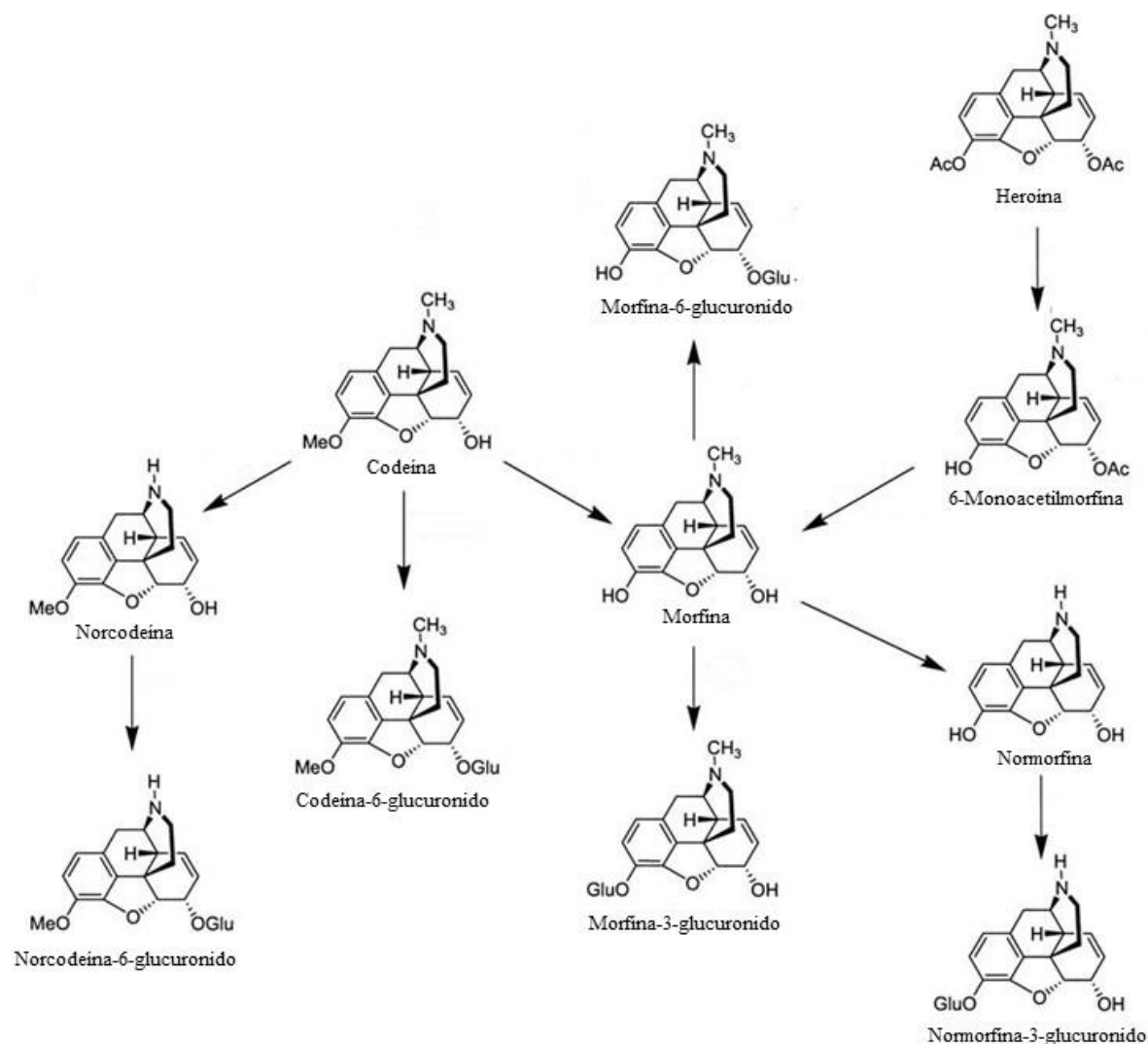
Os opiáceos são substâncias obtidas a partir do ópio, nome dado ao exsudado leitoso obtido a partir do fruto imaturo da planta *Papaver somniferum*. Os opiáceos podem ser de origem natural (ou seja, derivados do ópio que não sofreram nenhuma modificação, como, por exemplo, a morfina e a codeína), de origem semi-sintética (resultantes de modificações parciais das substâncias naturais, como é o caso da heroína e da buprenorfina) e opiáceos sintéticos, designados de opioides, por atuarem de forma semelhante aos opiáceos, mas serem inteiramente produzidos em laboratório, como a metadona, o fentanil ou o tramadol. Os opiáceos são agonistas dos recetores opioides, exercendo o seu efeito através da ligação aos principais tipos de recetores:  $\mu$  (mu),  $\kappa$  (kappa) e  $\delta$  (delta), localizados em diversos pontos do SNC, nas terminações nervosas periféricas e em diversos outros órgãos. Os opiáceos produzem elevada insensibilidade à dor (analgesia), pelo que são utilizados principalmente na terapia da dor moderada a aguda de alta intensidade, nomeadamente, como analgésicos pós-operatórios, nos traumas e queimaduras, e no tratamento da dor crónica, normalmente associada ao cancro. Os opiáceos, como por exemplo a codeína, também são utilizados como anti-tússicos e anti-diarreicos. Para além da sua utilização terapêutica, alguns são vulgarmente utilizados como droga recreativa de abuso, nomeadamente, a morfina e a heroína. Em doses elevadas produzem euforia, disforia, sedação e rigidez muscular. E no caso da administração de doses repetidas de forma prolongada originam fenómenos de tolerância e dependência, esta última caracterizada

pela síndrome de abstinência que ocorre quando se verifica uma suspensão abrupta do consumo com o subsequente desencadeamento de diversos sinais físicos e psicológicos, nomeadamente, agitação, irritabilidade, salivação excessiva, lacrimejo, sudorese, vômitos e diarreia. Adicionalmente, a utilização de opiáceos pode resultar em alterações do sistema nervoso autónomo e endócrino, bradicardia, hipotensão e depressão respiratória, que pode ser agravada nos casos de associação com outras drogas depressoras do SNC, nomeadamente, as benzodiazepinas. A depressão respiratória é o efeito secundário mais grave que pode, inclusive, provocar a morte em casos de sobredosagem. (Stout e Farrell, 2003)

O metabolismo dos opiáceos resulta na produção de metabolitos inativos e ativos, podendo estes últimos, em alguns casos, ser mais potentes do que o seu precursor. Apesar de diferirem no modo como são metabolizados, os opiáceos seguem, em muitos casos, padrões gerais de metabolização semelhantes. A maioria dos opiáceos, quando administrados por via oral, sofre extenso metabolismo de primeira passagem no fígado antes de entrarem na circulação sistémica, reduzindo a sua biodisponibilidade. A metabolização dos opiáceos envolve reações de modificação, que incluem, essencialmente, reações de desmetilação e hidrólise, e ainda, reações de conjugação com o ácido glucurónico (**figura 10**). (Smith, 2009; Stout e Farrell, 2003)

A principal via metabólica da morfina (o principal opiáceo utilizado no tratamento da dor intensa e/ou crónica) é a conjugação com o ácido glucurónico nos grupos hidróxilo fenólico livre e alanol para produzir a morfina-3-glucurónido (M3G) e a morfina-6-glucurónido (M6G), respetivamente. O M3G é o metabolito principal, é altamente solúvel em água e apresenta baixa afinidade pelos recetores, pelo que não exerce efeito opioide, mas aparentemente produz os mesmos efeitos secundários da morfina. Por outro lado, o M6G é um

metabolito farmacologicamente ativo, com um efeito analgésico duas vezes mais potente do que o da morfina. (Smith, 2009; Stout e Farrell, 2003)



**Figura 10** – Principais vias metabólicas da morfina, codeína e heroína.

Outro opiáceo amplamente utilizado, fundamentalmente como antitússico e no controlo da dor moderada, é a codeína. Apesar de ser um dos componentes naturais do ópio, a codeína é também produzida comercialmente a partir da 3-O-metilação da morfina. A codeína é metabolizada através da O-desmetilação e da N-desmetilação dando origem à morfina e à norcodeína, respetivamente, e através da conjugação à codeína-6-glucuronido (C6G), que possui atividade

farmacológica semelhante à codeína. O efeito analgésico da codeína é menos potente do que o da morfina, devido a uma afinidade muito mais baixa pelos recetores opióides  $\mu$ , resultando os seus efeitos farmacológicos maioritariamente da sua transformação em morfina. (Smith, 2009; Stout e Farrell, 2003)

A heroína (3,6-diacetilmorfina) é um opióide semi-sintético sintetizado a partir da morfina. As principais vias de administração são a injeção intravenosa, subcutânea e a inalação. Após a administração, a heroína é rapidamente hidrolisada para dar origem à 6-monoacetilmorfina (6-MAM) e posteriormente à morfina. A morfina por sua vez sofre reações de conjugação com o ácido glucurónico para formar o M6G e o M3G, como referido anteriormente. A conjugação do hidróxilo na posição seis não impede a ligação aos recetores opioides, pelo que o 6-MAM e o M6G contribuem para os efeitos narcóticos da heroína, que possui ela própria baixa afinidade pelos recetores opioides. A concentração da heroína no sangue, decresce muito rapidamente após a administração intravenosa da droga e fica indetetável ao fim de 10 a 40 minutos. Devido ao seu tempo médio de vida muito curto, a heroína normalmente não é detetada no sangue sendo a confirmação da presença do 6-MAM um indicador da administração muito recente da droga, ao contrário da morfina e seus metabolitos que podem ser detetados por períodos de tempo muito mais longos. (Jurado, 2013)

Uma vez que a morfina é o principal metabolito de diversos opiáceos, a sua deteção isoladamente não permite a identificação da substância administrada, e por exemplo, entre um consumo de heroína, substância vulgarmente utilizada como droga recreativa de abuso, ou uma utilização terapêutica de uma substância prescrita (como por exemplo, no caso da codeína). No caso da heroína, a confirmação da sua administração passa pela identificação do metabolito intermédio específico, o 6-MAM. Contudo, e como referido anteriormente, esta substância

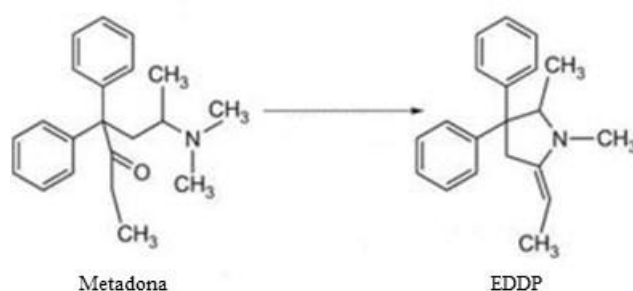
apresenta um tempo médio de vida muito curto, sofrendo rapidamente a reação de deacetilação para dar origem à morfina.

#### 1.4.4. METADONA

A metadona é um opioide sintético de ação prolongada, agonista dos recetores opioides  $\mu$ , com potente ação analgésica, utilizada principalmente nos programas de substituição incluídos no tratamento de pessoas dependentes de heroína e outros opiáceos. Desprovida dos efeitos euforizantes da heroína, a metadona é capaz de reduzir os fenómenos de desejo e abstinência, atenuando assim a necessidade do paciente consumir heroína. A metadona é administrada oralmente em solução ou comprimidos e a sua absorção é rápida e quase completa, resultando numa biodisponibilidade alta mas variável dependendo do indivíduo. A metadona é caracterizada pela elevada variabilidade interindividual da sua farmacocinética, que é responsável em parte pelos diferentes padrões de resposta obtidos durante o tratamento de substituição com metadona. Vários são os estudos que referem o facto de se obterem diferentes níveis de concentração de metadona no plasma a partir de uma única toma, contribuindo para uma maior variação na resposta clínica. A metabolização da metadona ocorre principalmente no fígado através de um processo de N-desmetilação seguida de uma reação de ciclização para dar origem ao principal metabolito inativo, o EDDP (2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolideno) (**figura 11**). (Garrido e Trocóniz, 1999; Eap et al., 2002; Li et al, 2008) Normalmente, o tratamento de substituição com metadona é bem tolerado numa perspetiva de longo prazo, sendo que os principais efeitos secundários incluem: sonolência, hipotensão, edema das mãos e dos pés, obstipação, sudorese excessiva, tonturas, náuseas, vômitos e depressão respiratória. Contudo, têm sido reportadas mortes relacionadas com o consumo de metadona, que parecem estar associadas ao risco de sobredosagem durante a indução do



tratamento e com a prática comum de fornecer ao paciente as doses para tomar autonomamente, com potenciais complicações associadas, como, por exemplo, os erros de auto-administração, a combinação com outras substâncias, a ingestão da metadona pelo paciente com a intenção de causar dano a si próprio e a obtenção da substância através de mercados ilícitos. (Saracino et al., 2012)



**Figura 11** – Principal via metabólica da metadona.

### 1.5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA ANÁLISE DE DROGAS DE ABUSO PELA TÉCNICA DE DBS

Atualmente, já existem diversas publicações e trabalhos apresentados em reuniões científicas que documentam o potencial da aplicação da técnica de DBS para a análise de drogas de abuso, nomeadamente, para as substâncias envolvidas neste estudo (**tabela 1**). Relativamente aos trabalhos publicados, importa realçar que na sua totalidade são estudos aplicados a amostras de sangue colhidas *in vivo*, e que apesar de estes incluírem na sua maioria a análise de amostras reais, um número substancial utiliza a preparação das DBS através da pipetagem de um volume pré-definido de sangue venoso (por exemplo, Antelo-Domínguez et al., 2013; Garcia Boy et al., 2008; Jantos et al., 2011; Saussereau et al., 2012), e apenas um número limitado de relatórios descreve a análise de amostras DBS preparadas a partir da colheita de sangue capilar (nomeadamente, Mercolini et al., 2010; Saracino et al., 2012; Sosnoff et al., 1996), sendo que,

nestes casos, as *DBS* podem ser preparadas através da colheita de sangue por punção seguida de recolha utilizando um capilar de precisão e posterior aplicação de um volume pré-definido de sangue capilar no papel de filtro, opção utilizada no trabalho publicado por Mercolini et al.. Adicionalmente, importa referir que, num número considerável de publicações as *DBS* foram obtidas a partir da aplicação de volumes superiores ou iguais a 50  $\mu\text{L}$  (por exemplo, Alfazil e Anderson, 2008; Clavijo et al., 2011; Garcia Boy et al., 2008; Jantos et al., 2011, Langel et al., 2011; Schutz et al., 2002), sendo que estes volumes dificilmente se conseguem alcançar a partir de uma punção no dedo, cujo volume de sangue normalmente obtido é inferior a 40  $\mu\text{L}$ , de acordo com Stove et al.. (Stove et al., 2012)

Na **tabela 1** é feita referência ao tipo de papel de filtro utilizado nas diferentes aplicações, com exceção de três casos, em que essa informação não foi possível obter (Langel et al., 2011; Sosnoff et al., 1996; Shutz et al., 2002) e ao procedimento de extração adotado. De acordo com esta tabela, verifica-se que existe alguma variedade no tipo e marca do papel de filtro utilizado, sendo que na maior parte dos casos o papel de filtro Whatman® 903 foi o selecionado, observando-se uma grande variedade nos métodos utilizados para a extração dos analitos, que incluem desde os procedimentos mais simples de extração com solventes orgânicos (Ambach et al., 2013; Antelo-Domínguez et al., 2013; Mercolini et al., 2010; Thomas et al., 2012), a metodologias mais complexas que envolvem mais passos, nomeadamente, de redissolução da mancha com um solvente aquoso e posterior procedimento de precipitação de proteínas (Clavijo et al., 2011; Sosnoff et al., 1996), ou de extração por *SPE* ou *LLE* (Alfazil e Anderson, 2008; Garcia Boy et al., 2008; Jantos et al., 2011; Langel et al., 2011; Saracino et al., 2012; Schutz et al., 2002), e ainda, em alguns outros casos, o recurso a técnicas de extração automáticas *online* (Lauer et al., 2011; Sausseureau et al., 2012; Thomas et al., 2010; Versace et al., 2013).

**Tabela 1** – Revisão bibliográfica da análise de drogas de abuso pela técnica de DBS.

<i>Referência bibliográfica</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Tipo de papel</i>	<i>Vol. amostra/Tipo de amostr. (A – diretam. no papel; B – pipetagem)/Diâmetro da mancha utilizado</i>	<i>Procedimento de extração</i>	<i>Tecnologia analítica</i>	<i>Principais parâmetros de validação</i>	<i>Estudos de Estabilidade</i>	<i>Aplicação/ Amostras reais/Estudo comparativo</i>
Alfazil e Anderson, 2008	Benzodiazepina, <b>Cocaína</b>	Guthrie card 903®	100 µL/ Método B/ Totalidade da mancha (13 mm)	Tampão fosfato pH 6; SPE	LC-MS/MS (LCQ Deca XP Thermo Finnigan)	Linearidade: 2-500 ng/100 µL/ $r^2=0,994$ ; LD: 0,74 ng/100 µL; LQ: 2,46 ng/100 µL; Rec.: 90 - 97%; Precisão: 5,4 - 12,8%.	Temp. amb.; 4°C; -20°C durante 1 mês	Desenvolvimento de um método para a análise e preservação de substâncias hidroliticamente instáveis em amostras de sangue seco./Estudo de estabilidade.
Ambach et al., 2013	64 drogas psicoativas entre quais: <b>anfetamina, MDMA, MDA, metanfetamina.</b>	PerkinElmer 226-1004	10 µL/Método B/ Totalidade da mancha (10 mm)	Metanol	LC-MS/MS (Qtrap 5500 ABSciex)	Selectividade; Efeito matriz; LD: 1 - 5 ng/mL; Rec.: 88 – 98%.	Temp. amb.; 4°C durante 2 semanas	Desenvolvimento de um método de triagem para a detecção de 64 novas drogas psicoativas./Comparação com método validado em amostras de sangue total.
Antelo-Domínguez et al., 2013	<b>Cocaína, benzoilecgonina, morfina, codeína e 6-MAM</b>	Whatman 2012-10	20 µL/Método B/ Totalidade da mancha	Metanol	LC-MS/MS (API 2000)	Linearidade: 20 – 400 ng/mL (cocaína, benzoilecgonina), 100 – 2000 ng/mL (morfina, codeína, 6-MAM).	–	Desenvolvimento de um método simples e econômico de preparação das amostras na análise simultânea de cocaína, morfina e respectivos metabolitos./Aplicação a 13 amostras de indivíduos utilizadores de drogas de abuso e comparação com método utilizado na análise de amostras de sangue total.
Clavijo et al., 2011	<b>Morfina</b> , morfina 3β-glucuronído, morfina 6β-glucuronído	Whatman 903	50 µL/Método B/6,4 mm (vol. aprox. 20 µL)	Reconstituição com água; precipitação de proteínas.	LC-MS/MS (API 5000)	Linearidade: 0,25 – 1000 ng/mL; Efeito matriz; LD: 0,25 ng/mL; LQ: 1 ng/mL; Rec.: 99,6 – 108,3%; Precisão: 2,6 – 14,7%; Exatidão: 98,0 – 109,6%.	Três ciclos de congelação e descong./Temp. amb.; +4°C; -20°C e -80°C durante 7 dias/Teste de estab. amostras process. e analisadas após 4, 8, 12, 24, 48 e 168 h e no amostrador a +4°C analisadas após 12, 24 e 48 h.	Estudo de farmacocinética e de monitorização terapêutica da morfina e seus principais metabolitos em crianças./ Comparação com o método aplicado a amostras de plasma.
Garcia Boy et al., 2008	<b>Morfina e 6-MAM</b>	Whatman BFC 180	100 µL/Método B/ Totalidade da mancha	Tampão borato pH 8,5; LLE	LC-MS/MS (API 4000)	Linearidade: 5 – 50 ng/spot (100 µL) ( $r>0,99$ ); Efeito matriz; LD: 0,4 – 0,8 ng/spot; LQ: 1,4 – 2,7 ng/spot; Rec.: 23 – 37% morfina, 76 – 86% 6-MAM; Precisão: 4,7 – 9,0%; Exatidão: 99,6 – 102,8%.	40°C durante 5 dias/ 4°C e -20°C durante 7 dias.	Desenvolvimento de um método simples e preciso para de determinação de morfina e 6-MAM./Aplicação a 50 amostras reais./Comparação com o método aplicado a amostras de sangue total.

**Tabela 1** – Revisão bibliográfica da análise de drogas de abuso pela técnica de DBS.

<i>Referência bibliográfica</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Tipo de papel</i>	<i>Vol. amostra/Tipo de amostr. (A – diretam. no papel; B – pipetagem)/Diâmetro da mancha utilizado</i>	<i>Procedimento de extração</i>	<i>Tecnologia analítica</i>	<i>Principais parâmetros de validação</i>	<i>Estudos de Estabilidade</i>	<i>Aplicação/ Amostras reais/Estudo comparativo</i>
Henderson et al., 1993	<b>Benzoilecgonina</b>	Schleicher & Schuell (Grade 903)	6 mm (aprox. 12 µL de sangue)	Extração com tampão PBS: Tween20 para RIA; Reconstituição em tampão fosfato 0,2M (pH7) seguida de eluição em colunas Chem Elut e derivatização para GC-MS.	RIA; GC-MS	LD: 5 ng/mL; LQ: 10 ng/mL; Rec.: 95%	4°C, 25°C, 45°C e 55°C durante 1024h.	Comparação entre os dois métodos RIA e GC-MS para amostras no contexto de análises clínicas.
Jantos et al., 2011	<b>MDMA e MDA</b>	Whatman 903	100 µL/Método B/ Totalidade da mancha (18 mm)	NaOH 0,01M; LLE	LC-MS/MS (API 4000)	Linearidade: 5 – 40 ng/mL e 50 – 400 ng/mL MDMA, 0,25 – 3 ng/mL e 2,5 – 30 ng/mL MDA ( $r^2 > 0,995$ ); Efeito matriz; LD: 0,12 – 1,6 ng/mL; LQ: 0,4 – 5,7 ng/mL; Rec.: >85%; Precisão: 2,23 – 4,99%.	Teste da estabilidade das amostras processadas e analisadas após 24h à temp. amb.	Desenvolvimento de um método e aplicação no contexto da condução sob a influência de drogas./Aplicação a 20 amostras reais colhidas a voluntários./Comparação com o método aplicado a amostras de sangue total.
Langel et al., 2011	23 substâncias entre as quais: <b>anfetamina, cocaína, codeína, MDA, MDMA, metadona, metanfetamina, morfina.</b>	–	100 µL/Método B/ Totalidade da mancha	LLE	GC-MS	Linearidade: 10 – 1000 ng/mL; 20 – 2000 ng/mL; 50 – 1000 ng/mL ( $r^2 > 0,98$ ); LQ: 10 – 50 ng/mL; Rec.: >75% (50% para a morfina); Precisão e Exatidão: <15% e <20% para o LQ.	–	Desenvolvimento de um método para a determinação de 23 substâncias, que incluem, drogas de abuso e medicamentos.
Lauer et al., 2011	90 substâncias entre as quais: <b>anfetamina, benzoilecgonina, cocaína, MDA, MDMA, metadona, metanfetamina, opiáceos.</b>	Whatman 903	Análise parcial da mancha correspondente a um volume de 5 µL	Desorção <i>online</i> diretamente da DBS.	LC-MS/MS (5500 Qtrap ABSciex)	Selectividade; LD: 1 – 10 ng/mL.	–	Desenvolvimento de um método de triagem e semi-quantificação de 90 substâncias, que incluem, analgésicos, antidepressivos, benzodiazepinas, analgésicos, neurolépticos e drogas de abuso./Aplicação a amostras reais.

**Tabela 1** – Revisão bibliográfica da análise de drogas de abuso pela técnica de DBS.

<i>Referência bibliográfica</i>	<i>Substâncias</i>	<i>Tipo de papel</i>	<i>Vol. amostra/Tipo de amostr. (A – diretam. no papel; B – pipetagem)/Diâmetro da mancha utilizado</i>	<i>Procedimento de extração</i>	<i>Tecnologia analítica</i>	<i>Principais parâmetros de validação</i>	<i>Estudos de Estabilidade</i>	<i>Aplicação/ Amostras reais/Estudo comparativo</i>
Mercolini et al., 2010	<b>Cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno</b>	Whatman 903	10 µL/Método B (sangue capilar)/ Totalidade da mancha	Metanol	HPLC-Detector de fluorescência	Selectividade; Linearidade: 20 – 1000 ng/mL ( $r^2 > 0,9995$ ); LD: 7 ng/mL; LQ: 20 ng/mL; Rec.: 92 – 95%; Precisão: 3,5 – 4,7%; Exatidão: >90%.	–	Desenvolvimento de um método para a determinação simultânea de cocaína e metabolitos./ Aplicação a amostras reais de indivíduos consumidores habituais de cocaína./Comparação com método aplicado a amostras de plasma.
Mommers et al., 2013	<b>Morfina</b>	Whatman 903	30 µL/Método A e B/ 3 mm	Água/Metanol (9:1, v/v)	LC-MS/MS (Agilent 6410 triple quadrupole)	–	–	Estudo comparativo sobre diferentes procedimentos de adição do PI às DBS e de diferentes técnicas de aplicação do sangue aos cartões./Estudo sobre a influência da aplicação de diferentes volumes de sangue.
Saracino et al., 2012	<b>Metadona</b>	Whatman FTA® classic cards	Método A e B /Totalidade das manchas.	Tampão fosfato/ACN (1:4, v/v); Secura; Redissolução em tampão fosfato; Microextração (MEPS).	HPLC – Detector colorimétrico (Coulchem III)	Selectividade; Linearidade: 4 – 500 ng/mL ( $r=0,9988$ ); LD: 1,2 ng/mL; LQ: 4 ng/mL; Rec.: >90%; Precisão: <5,8%; Exatidão: 87%.	Temp. amb. durante 1 mês.	Desenvolvimento de um método para a análise de metadona em pacientes no contexto da sua monitorizaçãoterapêutica./ Aplicação a amostras reais de 16 indivíduos em tratamento de substituição./Comparação com o método aplicado na análise de amostras de plasma.
Saussereau et al., 2012	<b>Anfetamina, benzoilecgonina, cocaína, cocaetileno, codeína, EME, 6-MAM, MDA, MDEA, MDMA, metanfetamina, morfina, M3G e M6G</b>	Whatman 903	30 µL/Método B/ 3 mm	Reconstituição em água; extração SPE <i>online</i> .	LC-MS/MS (QuattroMicro Waters)	Selectividade; Efeito matriz: sem supressão ou intensificação do sinal significativa; Rec.: 85,9 – 121,6%.	4°C e -20°C durante 6 meses.	Desenvolvimento de um método para a determinação simultânea de anfetaminas, opiáceos, cocaína e metabolitos./ Aplicação a 20 amostras reais colhidas em indivíduos no âmbito do <i>DUID</i> e comparação com o método utilizado em sangue total.
Sosnoff et al., 1996	<b>Benzoilecgonina</b>	–	Método A/6 mm (aprox. 12 µL de sangue)	Extração com sol. acetato de amônio 2mM; precipitação de proteínas com metanol.	LC-MS/MS (PE Sciex API III triple quadrupole mass spectrometer)	Linearidade: 0 – 100 ng/mL; LD: 2 ng/mL; LQ: 4 – 5 ng/mL.	–	Aplicação a amostras reais./Comparação entre os dois métodos RIA e LC-MS/MS para amostras no contexto de análises clínicas.

**Tabela 1** – Revisão bibliográfica da análise de drogas de abuso pela técnica de DBS.

Referência bibliográfica	Substâncias	Tipo de papel	Vol. amostra/Tipo de amostr. (A – diretam. no papel; B – pipetagem)/Diâmetro da mancha utilizado	Procedimento de extração	Tecnologia analítica	Principais parâmetros de validação	Estudos de Estabilidade	Aplicação/ Amostras reais/Estudo comparativo
Schutz et al., 2002	14 substâncias entre as quais: <b>anfetamina, benzoilecgonina, cocaína, codeína, MDA, MDMA, metanfetamina e morfina.</b>	–	50 µL/Método B/Totalidade da mancha	Metanol; extração SPE utilizando um robot Gilson ASPEC XL.	GC-MS	Linearidade: $r > 0,996$ LD: 1,62 – 4,91 ng/spot;	–	Desenvolvimento de um método de triagem e detecção simultânea de anfetaminas, opiáceos, canabinoides, cocaína e metabolitos.
Thomas et al., 2010	16 substâncias entre as quais: <b>codeína e morfina.</b>	Schleicher & Schuell (Grade 903)	5 µL/Método B	Desorção <i>online</i> diretamente da DBS.	LC-MS/MS (ITMS Esquire 3000+ Bruker Daltonics)	–	–	Desenvolvimento de um método para a análise de drogas e seus metabolitos polares num total de 16 substâncias através de um procedimento de desorção da DBS <i>online</i> acoplado a um sistema automático de análise que combina colunas HILIC e RP com ESI-MS/MS.
Thomas et al., 2012	26 substâncias com interesse no contexto do controlo da dopagem entre as quais: <b>cocaína, MDA e MDMA</b>	Sartorius TFN cards	20 µL/Método B/ Totalidade da mancha	Metanol/tert-Butilmetileter (1:4, v/v) e acetona.	UHPLC-Orbitrap (Q Exactive mass spectrometer Thermo Fisher)	Selectividade; Linearidade: 0 – 20 ng/mL ( $r > 0,98$ ); Efeito matriz: LD: 0,05 – 0,5 ng/mL; LQ: 0,25 ng/mL cocaína; Rec.: 62 – 78%; Precisão: 6 – 11%; Exatidão: 87 – 116% cocaína.	2 – 8°C analisadas após 0, 1, 3 e 7 dias.	Estudo sobre a aplicação da técnica de DBS na área do controlo da dopagem no desporto. Desenvolvimento de um método essencialmente qualitativo com exceção para 6 substâncias cuja quantificação é relevante (na quais se encontra a cocaína).
Versace et al., 2013	22 substâncias entre as quais: <b>anfetamina, benzoilecgonina, cocaína, codeína, 6-MAM, MDMA, metanfetamina, metadona e morfina</b>	Whatman 903	5 µL/Método B/ Totalidade da mancha.	Metanol utilizando um sistema automático de extração <i>online</i> .	LC-MS/MS (5500 Qtrap ABSciex)	Selectividade; Efeito matriz; LD: $< 1$ – 100 ng/mL; Rec.: 10 – 105%.	–	Desenvolvimento de um método para a análise de 22 substâncias frequentemente encontradas na área forense, através de um procedimento de desorção da DBS <i>online</i> acoplado a um sistema automático de análise que combina colunas HILIC e RP com ESI-MS/MS./Aplicação a 34 amostras reais e comparação com os procedimentos de triagem por GC-MS e LC-DAD e por GC-MS/MS e LC-MS/MS utilizando amostras de sangue total.

Relativamente às técnicas analíticas adotadas é de referir que, devido aos volumes reduzidos de amostra normalmente envolvidos na técnica de *DBS*, aliado ao facto de frequentemente se requerer a deteção de valores baixos de concentração dos analitos, se justifica a necessidade e/ou preferência pela técnica de *LC-MS/MS* na grande maioria das aplicações. Thomas et al. utilizaram a tecnologia de alta resolução Orbitrap, no desenvolvimento de uma metodologia para a deteção de 26 substâncias com interesse no contexto do controlo da dopagem que incluem: a cocaína, o MDA e o MDMA. Outras técnicas analíticas têm sido utilizadas para a identificação e quantificação de drogas de abuso nas *DBS*, nomeadamente, o *HPLC* com detetor de fluorescência para a deteção da cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno (Mercolini et al., 2010) e colorimétrico para a deteção da metadona (Saracino et al., 2012). Também a técnica de *GC-MS*, tem sido igualmente aplicada na análise de anfetaminas, cocaína, metadona, opiáceos e respetivos metabolitos. (Henderson et al., 1993; Langel et al., 2011; Schutz et al., 2002). Contudo, as análises baseadas na técnica de *GC*, na sua maioria, envolvem a necessidade da execução de um passo de derivatização, o que muitas vezes é considerado como uma desvantagem.

Por último, importa ainda referir que na grande maioria das publicações verifica-se uma preocupação em apresentar uma validação do procedimento analítico adequada aos padrões de exigência atuais que incluem os principais parâmetros relevantes para a metodologia em causa, ficando contudo a faltar, em alguns casos, a realização de estudos de estabilidade dos analitos nas *DBS* e de comparação de valores de concentração obtidos através das metodologias tradicionais, normalmente baseadas em amostras de sangue venoso *versus* valores obtidos a partir das amostras *DBS*.

## **1.6. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS ENVOLVENDO A TÉCNICA DE *DBS***

A validação de um método analítico consiste na aplicação de determinados procedimentos experimentais de modo a garantir que o método é confiável e apto à finalidade a que se destina. A validação de um método utilizado na análise de drogas de abuso é extremamente importante, uma vez que um método pouco fiável pode resultar em falsos positivos ou negativos, ou na obtenção de um valor de concentração para um determinado analito significativamente superior ou inferior ao valor real presente na amostra, podendo traduzir-se numa incorreta interpretação dos resultados, que, por seu lado, pode ter efeitos graves, como, por exemplo, consequências jurídicas infundadas para um réu em tribunal. Por isso, torna-se particularmente importante a utilização de métodos analíticos validados na área da toxicologia forense de modo a garantir a obtenção de resultados precisos e inquestionáveis que possam fundamentar uma interpretação correta.

A validação de métodos analíticos para a confirmação e quantificação de compostos endógenos e exógenos em matrizes biológicas tem sido tema de discussão em artigos científicos, conferências e comissões internacionais. Atualmente existem diversos documentos e publicações que descrevem os parâmetros que devem ser avaliados e fornecem diferentes diretrizes com o objetivo de orientar quanto à forma mais adequada de proceder à validação de métodos analíticos. De acordo com as principais recomendações internacionais, no caso da validação de métodos quantitativos, como é o caso do presente trabalho, os parâmetros de validação a ser avaliados devem incluir: seletividade, eficiência de extração, arrastamento, efeito de matriz, limite de deteção e de quantificação, modelo de calibração (linearidade), repetibilidade, precisão intermédia, exatidão e robustez. (SWGTOX; Peters e Maurer, 2002) Para além dos parâmetros de validação anteriores, no caso das análises a partir de amostras *DBS*



pode surgir a necessidade de ter que se estudar outros parâmetros que permitam avaliar a influência do comportamento dos analitos nas *DBS* no desempenho do método analítico.

O aumento nos últimos anos do número de ensaios desenvolvidos utilizando as *DBS*, estimulou a comunidade científica a debruçar-se sobre os requisitos próprios da validação de métodos analíticos baseados nesta técnica. Embora os critérios gerais de aceitação para a validação do método e análise de amostras não serem influenciados pelo facto de se utilizarem amostras *DBS* em substituição das tradicionais amostras líquidas, é importante reconhecer que o protocolo experimental terá necessariamente que sofrer algumas alterações em comparação com o modelo atual de desenvolvimento e validação de um método analítico, a fim de poder ultrapassar outros desafios científicos suscitados pelas *DBS*, surgindo assim a forte necessidade de orientações claras sobre o desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos a partir de amostras *DBS*.

Em 2006, foi fundado o *European Bioanalysis Forum (EBF)*, que consiste numa organização internacional formada por 12 empresas farmacêuticas europeias com o objetivo de implementar uma plataforma de discussão sobre ciência, procedimentos e tecnologias analíticas, ferramentas de negócios e questões regulatórias. ([www.europeanbioanalysisforum.eu](http://www.europeanbioanalysisforum.eu)) Em 2011, o *EBF* elaborou um documento onde apresentou uma série de recomendações especiais, com o objetivo de fornecer orientações sobre a validação de métodos bioanalíticos para as *DBS*. As recomendações recaem sobre as (potenciais) diferenças e considerações especiais necessárias para a validação do método e análise de amostras baseadas na técnica de *DBS* em comparação com os ensaios tradicionais baseados em amostras líquidas (Timmerman et al., 2011; Timmerman et al., 2011a).

**Efeito do hematócrito, homogeneidade e volume de amostra**

De acordo com este documento e tal como foi referido anteriormente no ponto 1.1.3., o hematócrito é atualmente identificado como o parâmetro mais importante diretamente relacionado com a viscosidade do sangue e, consequentemente, com influência direta na sua distribuição nos cartões *DBS*, o que pode ter impacto na validade dos resultados obtidos numa análise quantitativa, influenciando a formação, o tamanho, o tempo de secagem e a homogeneidade das manchas de sangue, e em última análise, afetando a robustez e reprodutibilidade dos ensaios analíticos, isto, particularmente, no caso em que apenas uma parte da mancha é utilizada na análise, em vez da sua totalidade. A escolha entre um método baseado numa parte da *DBS* ou na sua totalidade deve ser feita idealmente antes de dar início ao desenvolvimento de um método baseado na técnica de *DBS*, uma vez que esta decisão tem repercussões importantes sobre quais os parâmetros que devem ser incluídos no protocolo de validação. Mais concretamente, no caso de um procedimento analítico baseado em parte da mancha de sangue seco a sua validação deve incluir a avaliação de parâmetros complementares, nomeadamente, o estudo da influência: do local de onde se retira a mancha (homogeneidade), do volume de sangue e do valor de hematócrito, uma vez que estes parâmetros podem ter impacto no resultado quantitativo. Tendo em conta, que no presente trabalho foi utilizada a totalidade da *DBS*, e não apenas uma parte da mancha, a influência do hematócrito na viscosidade do sangue e consequente efeito na distribuição e homogeneidade da amostra no papel de filtro deixa de ser relevante, pelo que não é necessário proceder à validação destes parâmetros.

### **Adição do PI**

Em relação ao PI é importante ter presente que os procedimentos atualmente mais utilizados para a sua adição às *DBS*, tipicamente em solução num solvente orgânico utilizado para extrair os analitos da mancha de sangue seco, não abrangem todos os aspetos necessários de compensação analítica pretendidos de um PI, nomeadamente, as flutuações na extração ou redissolução dos analitos de interesse a partir do papel de filtro, pelo que, é importante que seja investido tempo suficiente no desenvolvimento de um procedimento de extração robusto. E, por outro lado, é recomendável que se proceda ao estudo da presença de possíveis diferenças de comportamento do analito *versus* PI, uma vez que se podem verificar diferenças significativas na eficiência da extração, dependendo do analito, da amostra de sangue e do tempo de armazenagem. Além disso, o recurso a outras técnicas de adição do PI numa fase mais precoce do processo analítico deve ser tido em consideração e ser avaliado em termos da sua maior adequabilidade.

### **Eficiência da extração**

Em relação à eficiência da extração o requisito essencial é que a extensão da recuperação de um analito e do PI seja consistente, precisa e reproduzível. Tendo em consideração as limitações da compensação analítica oferecida pelo PI no que diz respeito à recuperação da extração e das potenciais diferenças com respeito ao analito no papel de filtro, deve-se ter especial atenção no desenvolvimento do procedimento de extração e a recuperação deve ser avaliada e documentada mais aprofundadamente no caso dos ensaios a partir das *DBS*, nomeadamente, com o estudo do impacto do armazenamento dos cartões na recuperação (como parte do estudo da estabilidade a longo prazo), ou seja, durante o desenvolvimento e validação do método, deve-se ter em

consideração e tentar antecipar potenciais mudanças de comportamento da extração dos analitos a partir de amostras antigas *versus* amostras de sangue seco recentes.

### **Diluição das amostras**

Os princípios de diluição utilizados nas amostras líquidas também se aplicam nas *DBS*. Contudo, devido às limitações específicas desta técnica relacionadas com o facto de se tratar de uma matriz seca, não permite que as amostras *DBS* sejam diluídas diretamente como acontece com as amostras líquidas. Por esta razão, a abordagem mais utilizada é a diluição das amostras após extração com um extrato obtido a partir de uma amostra *DBS* branca, ou seja, isenta de qualquer um dos analitos em estudo. Este procedimento deve ser devidamente testado e documentado durante a validação do método.

### **Estabilidade dos analitos nas *DBS***

A instabilidade das substâncias nas amostras biológicas durante o seu transporte e armazenamento tem sido relatado em diversos estudos e pode representar um desafio para o toxicologista. Nos laboratórios de toxicologia forense é frequente passar algum tempo desde o momento da colheita até que as amostras sejam analisadas, inclusive, em alguns casos, pode ser necessário que as amostras tenham que ser reanalisadas bastante tempo depois (meses ou até anos), pelo que nesses casos apenas são detetados os analitos que permanecem estáveis por longos períodos de tempo, o que pode ter sérias implicações, nomeadamente, na interpretação dos resultados analíticos. A degradação das substâncias numa amostra biológica resultam essencialmente de três tipos de reações: redução, oxidação e hidrólise (Drummer, 2004; Waterman e Adami, 2005). As substâncias que contêm grupos amida e éster nas suas estruturas químicas, como, por exemplo no caso da cocaína, têm tendência para sofrer degradação por hidrólise (Waterman e Adami, 2005). A utilização das *DBS* pode representar uma vantagem,

uma vez que este processo pode ser reduzido ou minimizado nas amostras de sangue seco, tal como reportado anteriormente (Alfazil e Anderson, 2008; Garcia Boy et al., 2008). Por outro lado, a estabilidade dos analitos nas *DBS* depende de diversos fatores, nomeadamente, o tipo de papel, a temperatura, a humidade e o tempo de armazenamento, pelo que é importante estudar a estabilidade dos analitos durante o procedimento de validação, para poder concluir sobre quais as melhores condições de armazenamento.

### **Análise de amostras reais**

A utilização de um método utilizando a técnica de *DBS* como uma alternativa aos métodos tradicionais baseados em amostras líquidas de sangue total ou plasma requer a realização de experiências adicionais para verificar a equivalência ou correlação entre os resultados. Idealmente, antes da implementação do método, a sua validade deve ser testada através da sua aplicação a um conjunto de amostras reais avaliando a reprodutibilidade do método. Quando se trata de analisar *DBS* obtidas a partir de sangue capilar, a sua equivalência com concentrações no sangue venoso também deve ser avaliada.

## 2. OBJETIVOS DO ESTUDO

A amostragem por *DBS* é muito utilizada no diagnóstico de doenças metabólicas hereditárias em recém-nascidos e tem emergido como uma técnica importante para a análise quantitativa de moléculas pequenas e seus metabolitos, em estudos de fármaco e toxicocinética, estendendo-se à monitorização terapêutica. Contudo, a aplicação desta técnica ainda é relativamente rara na área da toxicologia forense, apesar de apresentar vantagens significativas quando comparada com as amostras de sangue total, a matriz de preferência em toxicologia forense.

Considerando na amostragem por *DBS*: *i*) a colheita rápida e minimamente invasiva (o que pode significar uma importante alternativa à amostra de sangue total); *ii*) o reduzido volume de amostra; *iii*) a redução do espaço e dos custos associados ao armazenamento das *DBS*; *iv*) a redução do tempo e dos custos associados à análise; *v*) a diminuição do risco de infecção por agentes patogénicos associados ao manuseamento da amostra; e *vi*) o aumento da estabilidade dos analitos suscetíveis de degradação por hidrólise, foram definidos como objetivos principais deste trabalho:

- O desenvolvimento e validação de uma metodologia de análise para a deteção, confirmação e quantificação de um grupo representativo de substâncias de interesse forense, que inclui as seguintes drogas de abuso: anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, morfina, codeína, 6-MAM, cocaína, benzoilecgonina, metadona e EDDP, através da utilização da amostragem por *DBS* em combinação com a tecnologia *UPLC-MS/MS*, aplicada a amostras colhidas no âmbito das atividades forenses;
- O estudo da estabilidade dos analitos nas *DBS* ao longo do tempo e em diferentes condições de armazenamento.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. PADRÕES E REAGENTES

Os materiais de referência da anfetamina, benzoilecgonina, EDDP, MDA, MDMA, metadona, metanfetamina, e dos PIs deuterados, anfetamina-d<sub>6</sub>, benzoilecgonina-d<sub>3</sub>, codeína-d<sub>3</sub>, MDMA-d<sub>5</sub>, metanfetamina-d<sub>3</sub>, metadona-d<sub>3</sub> e morfina-d<sub>3</sub> (grau de pureza  $\geq 99\%$ ), em solução a 1 mg/mL em metanol, e os materiais de referência da 6-monoacetilmorfina e dos PIs 6-monoacetilmorfina-d<sub>3</sub> e cocaína-d<sub>3</sub> (grau de pureza  $\geq 99\%$ ), em solução a 1 mg/mL em acetonitrilo foram fornecidos pela Cerilliant (Round Rock, EUA). Os padrões de referência da codeína, morfina e do PI EDDP-d<sub>3</sub> (grau de pureza  $> 99,5\%$ ), em solução a 1 mg/mL em metanol, e o padrão de referência da cocaína (grau de pureza  $> 99,6\%$ ), em solução a 1 mg/mL em acetonitrilo foram adquiridos à Lipomed (Arlesheim, Suíça).

O acetonitrilo, a água e o metanol (grau de pureza adequado para *LC-MS*) e o formato de amônio (p.a.) foram fornecidos pela Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O ácido fórmico 98-100% (p.a.) foi adquirido à Merck (Darmstadt, Alemanha). Outros reagentes utilizados no desenvolvimento da metodologia: acetato de etilo para cromatografia líquida, 2-propanol (p.a.) e tert-butilmetileter (p.a.) foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha).

#### 3.2. SOLUÇÕES

A partir das soluções-padrão individuais a 1 mg/mL, prepararam-se duas misturas-padrão de trabalho a 10 µg/mL, nos correspondentes solventes orgânicos, metanol ou acetonitrilo. A partir destas, prepararam-se diluições de modo a obter misturas-padrão de trabalho a 1; 0,1 e 0,01 µg/mL.

A partir das soluções-padrão individuais dos PIs deuterados, anfetamina-d6, codeína-d3, metanfetamina-d3 e morfina-d3 a 1 mg/mL, preparou-se uma mistura-padrão a 10 µg/mL em metanol. A partir das soluções-padrão individuais dos PIs, benzoilecgonina-d3, EDDP-d3, MDMA-d5 e metadona-d3, preparou-se outra mistura-padrão a 10 µg/mL em metanol. A partir da diluição adequada destas duas misturas-padrão, preparou-se uma mistura-padrão de trabalho com uma concentração final de 1 µg/mL para a anfetamina-d6, codeína-d3, metanfetamina-d3 e morfina-d3, e de 0,1 µg/mL para a benzoilecgonina-d3, EDDP-d3, MDMA-d5 e metadona-d3 em metanol.

A partir das soluções-padrão individuais dos PIs deuterados 6-acetilmorfina-d3 e cocaína-d3 a 1 mg/mL, prepararam-se duas soluções-padrão individuais a 10 µg/mL em acetonitrilo. A partir da diluição adequada destas duas soluções-padrão preparou-se uma mistura-padrão de trabalho com uma concentração final de 1 µg/mL para a 6-monoacetilmorfina-d3 e de 0,1 µg/mL para a cocaína em acetonitrilo.

Todas as soluções-padrão individuais e misturas-padrão foram armazenadas a -20°C e protegidas da luz solar.

A mistura de metanol/acetonitrilo (3:1, v/v) foi preparada num frasco de 250 mL ao qual se adicionaram 180 mL de metanol para *LC-MS* e 60 mL de acetonitrilo para *LC-MS*, medidos com a ajuda de duas provetas de volume adequado. A mistura foi devidamente homogeneizada e mantida a uma temperatura de 2 a 8°C.

O solvente A da fase móvel, acetonitrilo/formato de amónio 2 mM (ácido fórmico 0,1%) (95:5, v/v), foi preparado num balão volumétrico de 1000 mL ao qual foi adicionado acetonitrilo para *LC-MS* até perfazer o volume total. Posteriormente, retirou-se 50 mL com a ajuda de uma



proveta. Ao volume remanescente no balão foram adicionados 50 mL de uma solução de formato de amónio 2 mM (ácido fórmico 0,1%), agitando até homogeneizar.

O solvente B da fase móvel, formato de amónio 2 mM (ácido fórmico 0,1%)/acetonitrilo (95:5, v/v) foi preparado num balão volumétrico de 1000 mL ao qual se adicionaram cerca de dois terços do seu volume de água para *LC-MS*, 2 mL de formato de amónio 1 M e 1 mL de ácido fórmico e agitou-se. Perfez-se o volume do balão volumétrico com água para *LC-MS* e homogeneizou-se. Posteriormente, retirou-se 50 mL, com a ajuda de uma proveta e adicionou-se ao volume remanescente no balão 50 mL de acetonitrilo para *LC-MS*. Agitou-se até homogeneizar.

Para a preparação da solução aquosa de formato de amónio 1 M, pesaram-se na balança analítica 3,135 g de formato de amónio, transferiu-se para uma balão volumétrico de 50 mL ao qual se adicionou cerca de dois terços do seu volume de água para *LC-MS*. Agitou-se até à dissolução completa e perfez-se com água para *LC-MS*. A solução foi devidamente homogeneizada e mantida a uma temperatura de 2 a 8°C.

A mistura de solvente B/solvente A (9:1, v/v) foi preparada num frasco de 50 mL ao qual se adicionaram 45 mL do solvente B, medidos com a ajuda de uma proveta, e 5 mL do solvente A, medidos com a ajuda de uma pipeta de vidro graduada. A mistura foi devidamente homogeneizada e mantida a uma temperatura de 2 a 8°C.

### 3.3. EQUIPAMENTOS

- Balança analítica da Kern & Sohn GmbH, modelo 770-13 (Balingen-Frommern, Alemanha);
- Banho seco da Grant Instruments (Cambridge) Ltd, modelo QBT2 (Royston, Reino Unido);

- Banho de ultrassons equipado com termóstato da Branson® 3510 E-DTH (Danbury, CT, EUA)
- Câmara de fluxo laminar da Labcaire, modelo SC 12-R (Inglaterra);
- Centrifuga da Thermo-Heraeus, modelo Megafuge 1.0 (Osterode, Alemanha);
- Cromatógrafo de líquidos *UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)*, modelo Acquity, composto por: uma bomba binária; um injetor automático de volume variável com sistema de refrigeração para as amostras e um forno para a coluna cromatográfica, acoplado a um espectrómetro de massa/massa com um analisador do tipo triplo quadrupolo e fonte de ionização ESCi, modelo Acquity TQ Detector, controlado pelo *software* MassLynx, versão 4.1 SCN 919, da Waters (Milford, MA, EUA);
- Dispensadores de volume variável da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha);
- Estufa, modelo UM300 da Memmert GmbH (Schwabach, Alemanha);
- Evaporador de amostras da Caliper Life Sciences, modelo TurboVap LV (Mountain View, CA, EUA);
- Homogeneizador, modelo SRT2 da Stuart Scientific (Redhill Surrey, Reino Unido);
- Micropipetas de volume variável de 10 – 100 µL; 20 – 200 µL e de 100 – 1000 µL da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha);
- Vortex, modelo ZX<sup>3</sup> da Velp Scientifica srl (Usmate, Itália)

### 3.4. MATERIAIS

Para além do material de vidro e dos consumíveis correntes em laboratório, foram utilizados os cartões Whatman® BFC 180 e foram testados durante o desenvolvimento da metodologia também os cartões: Whatman® 903, Whatman® FTA DMPK-A, B e C, Whatman® FTA Elute fornecidos pela GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, EUA) e os cartões Bond Elut

DMS adquiridos à Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA). Foram ainda utilizados, para o armazenamento das amostras, envelopes Multi-Barrier da Whatman® e um agente excicante em saquetas individuais de 1 g, fornecidos pela GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, EUA).

### **3.5. AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

As amostras brancas de sangue, ou seja, isentas das substâncias a pesquisar, utilizadas durante o desenvolvimento e validação da metodologia de análise de drogas de abuso a partir das *DBS* foram obtidas de amostras *in vivo* e *post-mortem* colhidas no âmbito das atividades da Delegação do Sul do INMLCF, IP e de bolsas de sangue branco provenientes do banco de sangue do hospital de Santa Cruz. A análise de casos reais correspondem a amostras de sangue *in vivo* e *post-mortem* colhidas no âmbito das atividades da Delegação do Sul do INMLCF, IP cuja análise através da utilização das metodologias tradicionais em sangue total aplicadas na rotina do laboratório deram um resultado positivo para uma ou mais das substâncias presentes neste estudo. Todas as amostras de sangue foram conservadas a -10°C.

Importa ainda referir, que a utilização de amostras de sangue colhidas no âmbito das atividades periciais do INMLCF, IP para fins de investigação científica, encontra-se previsto no artigo 31º da Deliberação nº 849/2010, de 07 de Maio (Regulamento Interno do INMLCF, IP), pelo que não suscita questões de natureza ética ou legal.

### **3.6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.6.1. CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS**

As amostras foram analisadas utilizando um cromatógrafo de líquidos Acquity UPLC acoplado a um espectrómetro de massa/massa triplo quadrupolo Acquity TQ Detector (Waters, Milford,

MA, EUA). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Acquity UPLC® HSS T3 (100 mm x 2,1 mm; 1,8  $\mu$ m) (Waters, Milford, MA, EUA) a uma temperatura de 35°C, e uma fase móvel formada por dois solventes, acetonitrilo/formato de amónio 2 mM (ácido fórmico 0,1%) (95:5, v/v) (solvente A) e formato de amónio 2 mM (ácido fórmico 0,1%)/acetonitrilo (95:5, v/v) (solvente B). O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e estabeleceram-se as condições de gradiente apresentadas na **tabela 2**, correspondendo a um tempo total de análise de 10 minutos. O volume de injeção utilizado foi de 10  $\mu$ L.

**Tabela 2** – Gradiente utilizado na separação cromatográfica.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0,00	10	90
0,10	10	90
2,45	55	45
6,00	95	5
8,00	95	5
8,05	10	90
10,00	10	90

O modo de ionização utilizado foi *ESI+* e no modo de aquisição *MRM*. Os parâmetros da fonte de ionização foram otimizados para a análise das drogas de abuso estabelecendo-se as seguintes condições: voltagem do capilar 1,0 kV; extrator 2,0 V; RF Lens 0,2 V; temperatura da fonte 120 °C; temperatura de dessolvatação 450 °C; fluxo do gás de dessolvatação (azoto) 600 L/h; não foi utilizado o gás de cone e o fluxo do gás de colisão (árgon) 0,14 mL/min. As transições *MRM*, com a correspondente voltagem de cone, energia de colisão e tempo de retenção para os analitos e PIs encontram-se na **tabela 3**. O controlo do equipamento e a aquisição de dados foi

realizada através do *software* MassLynx™ V4.1 SCN714 e o processamento de dados foi efetuado com recurso ao *software* TargetLynx™ V4.1 SCN 714.

**Tabela 3** – Transições MRM, voltagem de cone, energia de colisão e tempo de retenção (TR) para os analitos e PIs.

Substância	Transições (m/z)	Cone (V)	Colisão (eV)	TR (min)
Morfina	286 > 201; 165	50	24/36	0,83
<i>Morfina-d3</i>	289 > 201	50	24	0,83
Codeína	300 > 215; 183	50	24	1,23
<i>Codeína-d3</i>	303 > 215	50	24	1,23
6-Monoacetilmorfina	328 > 165; 211	55	34/26	1,38
<i>6-Monoacetilmorfina-d3</i>	331 > 165	55	34	1,38
Anfetamina	136 > 91; 119	20	12/8	1,40
<i>Anfetamina-d6</i>	142 > 125	20	8	1,40
MDA <sup>(a)</sup>	180 > 163; 105	20	10/20	1,44
Metanfetamina	150 > 91; 119	25	16/10	1,51
<i>Metanfetamina-d9</i>	159 > 125	25	10	1,50
MDMA	194 > 163; 105	20	16/20	1,53
<i>MDMA-d5</i>	199 > 165	20	16	1,52
Benzoilecgonina	290 > 168; 105	25	18/28	1,61
<i>Benzoilecgonina-d3</i>	293 > 171	25	18	1,61
Cocaína	304 > 182; 82	25	18/24	2,04
<i>Cocaína-d3</i>	307 > 185	25	18	2,04
EDDP	278 > 234; 186	50	34	2,79
<i>EDDP-d3</i>	281 > 189	50	34	2,79
Metadona	310 > 265; 105	35	16/24	3,00
<i>Metadona-d3</i>	313 > 268	35	16	3,00

<sup>(a)</sup> O PI utilizado foi o MDMA-d5.

### 3.6.2. PREPARAÇÃO DAS MANCHAS DE SANGUE SECO (*DBS*)

Uma vez que as amostras de sangue recebidas no SQTf são armazenadas a  $-10^{\circ}\text{C}$ , estas foram descongeladas até atingirem a temperatura ambiente e homogeneizadas, antes da preparação das manchas de sangue seco. As *DBS* foram produzidas a partir da aplicação, no papel de filtro Whatman® BFC 180, de um volume de sangue total de  $50\ \mu\text{L}$  medidos com a ajuda de uma micropipeta. Uma vez aplicado o sangue, as manchas foram secas durante a noite, protegidas da luz solar e à temperatura ambiente dentro de uma estufa. Uma vez secas as *DBS* foram analisadas, ou armazenadas para o estudo da estabilidade dos analitos nos cartões ao longo do tempo e em diferentes condições de armazenamento.

### 3.6.3. EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DAS *DBS*

Para a extração dos analitos a partir das *DBS*, primeiramente recortaram-se as manchas completas de sangue seco do cartão e colocaram-se em tubos de polipropileno de 10 mL. A cada um dos tubos foram adicionados 3 mL de uma mistura de metanol/acetonitrilo (3:1, v/v) e  $25\ \mu\text{L}$  de cada uma das misturas-padrão de trabalho dos PIs deuterados. Após a agitação dos tubos no vortex durante 30 segundos, as amostras foram colocadas no homogeneizador (*roller*) onde foram agitadas suavemente através de movimentos de rotação e inversão durante cerca de 30 minutos. Adicionalmente, as amostras foram submetidas a 30 minutos no ultrassons e, posteriormente, centrifugadas a 4000 rpm durante 20 minutos. De seguida, o solvente de extração foi transferido para tubos de vidro de fundo cónico e foram levados à secar no evaporador de amostras sob uma corrente de azoto e num banho a uma temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$ . A reconstituição dos resíduos secos foi feita através da adição de  $100\ \mu\text{L}$  de uma mistura equivalente às condições iniciais da fase móvel, ou seja, uma mistura do solvente B/ solvente A (9:1, v/v), seguida de agitação no vortex durante cerca de 10 segundos. Posteriormente foram

centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos e os sobrenadantes transferidos para viais de polipropileno.

### **3.7. PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO**

Tal como referido anteriormente, a confiança nos resultados analíticos obtidos é um aspeto fundamental na área da toxicologia forense, pelo que antes de ser aplicado na análise de amostras reais, o método analítico deve ser validado de modo a garantir a qualidade dos resultados. A validação do método analítico desenvolvido foi realizada de acordo com as recomendações internacionais e as práticas comuns utilizadas para a validação de métodos em toxicologia forense, e tendo em consideração as recomendações específicas do *EBF* para a validação de metodologias que envolvem a técnica de *DBS*. (SWGTOX; Timmerman et al., 2011) Pelo que, os parâmetros incluídos na validação foram os seguintes: seletividade; eficiência de extração; arrastamento; efeito de matriz; limite de deteção e de quantificação; modelo de calibração (linearidade); repetibilidade; precisão intermédia; exatidão; robustez; integridade da diluição e estabilidade.

#### **3.7.1. SELETIVIDADE**

Pode definir-se a seletividade de um método analítico como sendo a sua capacidade para identificar o(s) analito(s)-alvo de forma inequívoca, mesmo quando outras substâncias ou componentes de uma matriz complexa possam estar presentes na amostra. Para a avaliação da seletividade de um método não existe na literatura uma metodologia pré-estabelecida, sendo que a abordagem mais comum consiste na análise de um conjunto de amostras de diferentes origens para averiguar a eventual presença de possíveis interferentes. Assim sendo, para avaliar a seletividade do método analítico foram selecionadas quarenta amostras de sangue a partir de fontes distintas, sangue *post-mortem* e sangue colhido *in vivo*, isentas dos analitos em estudo e

representativas do universo de amostras analisadas no âmbito das atividades do SQTf. A partir destas, produziram-se dez *pools* de sangue total formadas por quatro amostras de origens diferentes (500 µL/cada, para um volume final de 2 mL). As dez *pools* foram preparadas em triplicado. Um primeiro conjunto de dez *pools* foi analisado diretamente, outro conjunto foi fortificado com os analitos em estudo numa concentração final de 10 ng/mL e ao último foram propositadamente adicionadas 24 substâncias diferentes selecionadas de entre os medicamentos mais frequentemente encontrados nas amostras analisadas na rotina do laboratório (que incluem, antidepressivos, antipsicóticos e benzodiazepinas), com o objetivo de estudar a presença de possíveis interferências. Adicionalmente, prepararam-se de modo semelhante três amostras de sangue branco para servirem de controlo (uma amostra branca, uma fortificada com os analitos em estudo e outra com os medicamentos). A partir de cada uma das amostras prepararam-se manchas de sangue em duplicado, deixaram-se secar, extraíram-se os analitos do papel de filtro e analisaram-se os extratos de acordo com o procedimento anteriormente descrito. O objetivo é verificar a negatividade das amostras não fortificadas e das amostras fortificadas com substâncias fora do âmbito deste estudo, e por outro lado, estabelecer a positividade das amostras fortificadas com os analitos-alvo mediante o cumprimento dos critérios de confirmação qualitativa, nomeadamente: o tempo de retenção (TR); o tempo de retenção relativo (TRR); as áreas relativas dos picos e a razão sinal/ruído (S/R).

De acordo com os critérios estabelecidos no SQTf para a identificação de uma dada substância, baseados nas recomendações do *International Standard for Laboratories* (documento técnico TD2010IDCR) da WADA, o TR do analito não deve diferir mais do que  $\pm 2\%$  ou  $\pm 0,1$  minutos do valor obtido para a mesma substância na amostra fortificada. Alternativamente, o TRR do analito (calculado de acordo com a **equação 1**) não deve diferir mais do  $\pm 1\%$  do valor obtido para o mesmo analito na amostra fortificada.



$$\Delta TRR = \frac{TRR_{amostra} - TRR_{controle}}{TRR_{controle}}$$

**Equação 1**

Em que:

$TRR_{amostra}$  – é o tempo de retenção relativo da substância na amostra;

$TRR_{controle}$  – é o tempo de retenção relativo da substância no controle.

As áreas relativas dos iões diagnóstico selecionados para uma dada substância na amostra (expressas, em percentagem, como a razão entre a área do ião diagnóstico de menor intensidade e a área correspondente ao ião pico base (ou de maior intensidade)) não devem diferir mais do que o correspondente valor apresentado na **tabela 4**, relativamente às áreas relativas dos mesmos iões diagnóstico na amostra controle. Por último, a razão S/R, correspondente à razão entre o sinal do ião diagnóstico menos intenso e o sinal correspondente ao ruído deve ser superior a 3. (WADA, 2010)

**Tabela 4** – Intervalo de tolerância para as áreas relativas dos iões diagnóstico.

Áreas relativas (% do pico base)	Intervalo de tolerância
> 50%	± 10% (absoluto)
≥ 25% e ≤ 50%	± 20% (relativo)
≥ 5% e < 25%	± 5% (absoluto)
< 5%	± 50% (relativo)

De acordo com os critérios estabelecidos pelo SQTF, considera-se que a seletividade de um método fica demonstrada se da análise das amostras negativas para os analitos-alvo resultar uma percentagem de falsos positivos de 0%, e da análise das amostras fortificadas com as substâncias em estudo resultar uma percentagem de falsos negativos igual ou inferior a 10%.

### 3.7.2. EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO

A eficiência da extração consiste na percentagem de analito que é recuperado da matriz biológica após a aplicação do procedimento de preparação das amostras, quando comparada com a quantidade conhecida do analito que se encontra efetivamente na amostra. No estudo da eficiência da extração é importante ter presente que esta pode variar em função da concentração do analito, pelo que a experiência para avaliar a eficiência da extração deve ser realizada a diferentes gamas de concentração dentro do intervalo de concentrações esperado para o analito de interesse. No presente trabalho, para a avaliação deste parâmetro, selecionaram-se dois valores de concentração, 20 e 200 ng/mL. Para cada uma das concentrações preparou-se uma amostra de sangue total, resultante de uma *pool* de sangues de diferentes fontes, com um volume final de 2 mL. A partir destas duas amostras, prepararam-se três manchas de sangue para cada uma das concentrações. Adicionalmente, prepararam-se também em triplicado manchas do mesmo sangue, mas sem ser contaminado com os analitos de interesse, para as duas gamas de concentração. Uma vez preparadas, as manchas de sangue foram secas e posteriormente submetidas ao procedimento de extração do papel de filtro descrito anteriormente. Importa referir que, para a avaliação deste parâmetro, as misturas-padrão dos PIs deuterados só foram adicionadas a todas as amostras após terminado o procedimento de extração, imediatamente antes do passo de secagem dos extratos. Adicionalmente, a cada conjunto de três manchas de sangue seco brancas foi adicionada, após a extração, a quantidade das misturas-padrão dos analitos em estudo, correspondente à respetiva concentração de 20 ng/mL e 200 ng/mL de sangue utilizado para produzir as manchas (50 µL). Uma vez secos, os extratos foram redissolvidos na fase móvel, centrifugados, transferidos e analisados. A avaliação da eficiência da extração para cada gama de concentração foi efetuada através do cálculo da percentagem de analito recuperado (%R), utilizando a seguinte **equação**:

$$\%R = \frac{A_{rel.com\ extração}}{A_{rel.sem\ extração}} \times 100$$

### Equação 2

Onde:

$A_{rel.com\ extração}$  – é a razão das áreas (analito/padrão interno) das amostras fortificadas antes das aplicação do procedimento de extração;

$A_{rel.sem\ extração}$  – é a razão das áreas (analito/padrão interno) das amostras fortificadas após a aplicação do procedimento de extração.

De acordo com o critério estabelecido pelo SQTF, para a aceitação dos resultados obtidos na avaliação da eficiência da extração, considera-se como adequado um intervalo entre 40 e 120%.

### 3.7.3. ARRASTAMENTO

A análise sequencial de um conjunto de amostras pode envolver fenômenos de arrastamento de um determinado analito, que possa estar presente numa concentração elevada numa amostra para as outras que sejam analisadas posteriormente, devido a vestígios da amostra que ficam possivelmente retidos ao nível do injetor, coluna e/ou detetor, produzindo deste modo um aumento artificial do sinal ou o aparecimento de um pico cromatográfico correspondente a uma substância numa amostra em que supostamente esta se encontra numa concentração inferior ou nem sequer se encontra presente, dando origem neste último caso a um resultado falso positivo, pelo que é extremamente importante a sua avaliação. Para o estudo da existência de fenômenos de arrastamento foram analisadas amostras brancas, ou seja, isentas dos analitos em estudo, imediatamente após amostras positivas numa gama alta de concentração. Para tal, prepararam-se duas amostras DBS brancas em simultâneo com as amostras do estudo da eficiência da extração (**ponto 3.7.2.**), injetaram-se estas intercaladas nas amostras de maior valor de concentração, e foram avaliadas em relação à presença ou não de possíveis contaminações.

#### 3.7.4. EFEITO DE MATRIZ

A coeluição com os analitos de interesse, de elementos endógenos e exógenos que compõem a matriz biológica (nomeadamente, outras substâncias, metabolitos, impurezas, produtos de degradação, etc) pode afetar a ionização dos analitos, podendo resultar na supressão ou intensificação do seu sinal, e consequentemente ter impacto na exatidão, precisão e robustez do método. A tecnologia *LC-MS/MS* é particularmente suscetível a este tipo de efeito, que depende essencialmente do tipo de matriz biológica, do procedimento de preparação das amostras, da eficiência da separação cromatográfica, da fase móvel e do tipo de ionização. (Peters et al., 2007)

Para avaliar este parâmetro a estratégia seguida consistiu na adoção do método da fortificação pós-extração, que consiste na comparação das áreas obtidas para um determinado analito, a partir de uma solução-padrão (ou seja, isenta de matriz biológica), com a correspondente área obtida a partir da análise de uma amostra branca fortificada após o procedimento extrativo. Esta avaliação permite não só quantificar o efeito de matriz, como também estudar a sua variabilidade em função da concentração do analito e de matrizes de diferentes origens dentro do mesmo tipo de matriz biológica (Peters et al., 2007). Assim sendo, o efeito de matriz foi avaliado através da realização de duas experiências distintas. Na primeira, foi estudada a variabilidade do efeito de matriz em função da concentração do analito presente na amostra a duas gamas de concentração (20 ng/mL e 200 ng/mL em triplicado). Esta experiência foi realizada em simultâneo com as amostras preparadas para o estudo da eficiência da extração (**ponto 3.7.2.**). Juntamente com estas, foram preparados seis tubos de vidro de fundo cónico aos quais foi adicionado o volume de solvente de extração normalmente utilizado, e a cada conjunto de três tubos foi adicionada a quantidade adequada das misturas-padrão dos analitos

em estudo, correspondente a cada uma das concentrações, no volume de sangue utilizado para preparar as manchas (50 µL). Na segunda experiência selecionaram-se dez amostras de sangue diferentes, isentas dos analitos em estudo e prepararam-se manchas de sangue em duplicado para cada uma das amostras. Uma vez secas, as DBS foram preparadas de acordo com o procedimento de extração anteriormente descrito. Após a extração e imediatamente antes do passo de secagem do extrato, as amostras foram fortificadas com uma quantidade adequada das misturas-padrão dos analitos em estudo, correspondente a uma concentração de 20 ng/mL (em 50 µL de sangue). Adicionalmente, prepararam-se dois tubos de vidro de fundo cónico com o mesmo volume do solvente de extração, que foram igualmente fortificadas com a mesma quantidade das misturas-padrão utilizadas na fortificação das amostras anteriores. Após secagem, as amostras foram redissolvidas, centrifugadas, transferidas e analisadas.

A percentagem do efeito da matriz (%EM) é calculada de acordo com a seguinte **equação**:

$$\%EM = \left[ \left( \frac{\bar{A}_{com\ matriz}}{\bar{A}_{sem\ matriz}} \right) - 1 \right] \times 100$$

### Equação 3

Onde:

$\bar{A}_{com\ matriz}$  – é a média das áreas absolutas obtidas para o ião pico base de um determinado analito nas amostras fortificadas após a aplicação do procedimento extrativo;

$\bar{A}_{sem\ matriz}$  – é a média das áreas absolutas obtidas para o ião pico base de um determinado analito nas amostras isentas de matriz.

### 3.7.5. LIMITE DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LD) corresponde ao valor mínimo de concentração do analito que o método consegue detetar e identificar inequivocamente de acordo com os critérios estabelecidos para a

identificação de uma substância, em termos do tempo de retenção relativo (TRR), áreas relativas dos picos e razão S/R, mas não necessariamente quantificar de acordo com critérios de exatidão e precisão aceitáveis. O limite de quantificação (LQ) corresponde ao valor mínimo de concentração do analito, cujo valor da razão S/R é igual ou superior a dez, e que pode ser quantificado de forma reprodutível, com exatidão e precisão consideradas adequadas, ou seja, apresentam valores para o coeficiente de variação (CV%) e para o erro em relação ao valor teórico (E%) igual ou inferior a 20%. Assim sendo, para a determinação do LD e do LQ prepararam-se cinco replicados independentes mediante a fortificação de alíquotas de uma amostra branca de sangue, para cada um dos seguintes valores de concentração: 0,5; 1; 2 e 5 ng/mL, selecionados na região do valor estimado para o LD e LQ. Adicionalmente, preparou-se para cada analito uma curva de calibração com nove pontos: 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 e 500 ng/mL, através da fortificação de uma amostra de sangue branco com a quantidade adequada das misturas-padrão dos analitos em estudo de modo a obter-se uma concentração final correspondente ao ponto da curva de calibração de maior valor (500 ng/mL). A partir desta amostra foram preparados os restantes pontos da curva de calibração através de um processo de diluições sucessivas. Uma vez preparadas as amostras de sangue, produziram-se as manchas, que, após secagem, foram submetidas ao procedimento de extração descrito anteriormente e analisadas. Os correspondentes valores de LD e LQ selecionados para cada um dos analitos foram avaliados em termos do cumprimento dos critérios de identificação estabelecidos relativamente ao TRR, às relações iónicas dos picos e à correspondente razão S/R, tendo-se utilizado como controlo positivo o calibrador com a concentração mais aproximada do valor selecionado. Para os replicados correspondentes ao LQ determinou-se ainda o CV% e o E%.

### 3.7.6. LINEARIDADE/MODELO DE CALIBRAÇÃO

Na aplicação de uma metodologia analítica quantitativa existe a necessidade de definir um intervalo de concentrações mínima (normalmente, correspondente ao respetivo valor de LQ) e máxima esperada para um determinado analito, designado por gama de trabalho. Quando a resposta do equipamento ou os sinais analíticos são proporcionais às concentrações analisadas, para toda a gama de trabalho, significa que existe homogeneidade de variâncias ao longo desse intervalo de concentrações (homocedasticidade). Neste caso, o modelo de calibração a testar é a regressão linear simples, onde os diferentes pontos da curva de calibração contribuem de igual forma para a regressão. Contudo, observa-se frequentemente que quando a gama de trabalho é superior a uma ordem de magnitude, a variância não é constante (heterocedasticidade), aumentando normalmente com a concentração. Nesta situação, a contribuição dos pontos da curva de calibração de maior concentração é superior à contribuição dos calibradores de menor concentração, o que se reflete negativamente na exatidão das quantificações realizadas na gama inferior da curva de calibração.

Nos casos em que se verifica a heterocedasticidade dos dados, a utilização da regressão linear ponderada (*WLSLR*, do inglês *Weighted Least Squares Linear Regression*) é a melhor forma de harmonizar as discrepâncias entre as variâncias dos diferentes pontos da curva de calibração minimizando os efeitos da contribuição dos calibradores de maior concentração, através da introdução de um fator de ponderação ( $w_i$ ), que idealmente, corresponde ao inverso da variância dos resultados experimentais obtidos para cada calibrador. Uma vez que, o seu cálculo por rotina num laboratório é impraticável, recorre-se normalmente ao estudo da aplicação de fatores de ponderação empíricos, baseados na variável independente  $x$  ou na variável dependente  $y$ , nomeadamente:  $1/x$ ;  $1/x^2$ ;  $1/\sqrt{x}$ ;  $1/y$ ;  $1/y^2$  e  $1/\sqrt{y}$ . (Almeida et al., 2002)

Sendo a regressão linear simples definida pela seguinte **equação**:

$$y = a + bx$$

**Equação 4**

Onde:

$y$  – é a variável dependente (resposta analítica);

$x$  – é a variável independente (concentração);

$a$  – é a interceção da curva no eixo das ordenadas ( $y$ );

$b$  – é o declive da curva de calibração.

Os parâmetros  $a$  e  $b$  da regressão linear ponderada para os diferentes fatores de ponderação ( $w_i$ ) podem ser calculados pela aplicação das **equações 5 e 6**, nas quais, quando  $w_i = 1$  os valores obtidos para os parâmetros  $a$  e  $b$  correspondem à regressão linear simples ou não ponderada.

$$b = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2}$$

**Equação 5**

$$a = \frac{\sum w_i x_i^2 \cdot \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2}$$

**Equação 6**

Onde  $(x_i, y_i)$  é o par de valores  $i$  de um total de  $n$  pares de valores.

Para obter o valor do coeficiente de correlação ( $r$ ) aplica-se a seguinte **equação**:

$$r = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \cdot \sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2}}$$

**Equação 7**



Para selecionar o melhor fator de ponderação calcula-se o erro relativo percentual ( $ER\%$ ) para cada calibrador e para os diferentes fatores de ponderação, através da aplicação da seguinte equação:

$$ER\% = \frac{C_{Exp.} - C_{Nom.}}{C_{Nom.}} \times 100$$

**Equação 8**

Onde:

$C_{Exp.}$  – é a concentração obtida a partir da regressão linear utilizando um fator de ponderação  $w_i$ ;

$C_{Nom.}$  – é a concentração nominal ou teórica presente no calibrador.

O fator de ponderação mais adequado é aquele cujo valor resultante do somatório de todos os erros relativos percentuais ( $\sum ER\%$ ) dos diferentes calibradores for menor, e que cumpra o critério de um coeficiente de correlação ( $r^2$ ) superior a 0,99. (Almeida et al., 2002)

Tendo em consideração o que atrás foi mencionado, para realizar o estudo da linearidade prepararam-se em cinco dias diferentes, cinco curvas de calibração com 7 a 9 pontos que cobrem toda a gama de trabalho (nomeadamente, do correspondente LQ a 500 ng/mL), para todos os analitos, através da fortificação de uma amostra de sangue branco com a quantidade adequada das misturas-padrão dos analitos em estudo de modo a obter-se uma concentração final correspondente ao ponto da curva de calibração de maior valor (500 ng/mL). A partir desta amostra foram preparados os restantes pontos da curva de calibração através de um processo de diluições sucessivas.

Uma vez analisadas as amostras procedeu-se ao estudo das curvas de calibração aplicando os diferentes fatores de ponderação de acordo com as equações apresentadas. Posteriormente, procedeu-se ao cálculo do  $\sum ER\%$  e da média dos valores de  $r^2$ .

### 3.7.7. REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMÉDIA

A precisão de um método analítico permite avaliar a capacidade do mesmo para obter resultados analíticos concordantes entre si, ou seja, permite examinar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, executados sobre uma amostra ou amostras semelhantes. Quanto menor esta dispersão, maior a precisão do método. As formas mais comuns de avaliar a precisão de um método consiste no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia, através do cálculo de três medidas de dispersão: o desvio-padrão; a variância e o coeficiente de variação ( $CV\%$ ).

A repetibilidade, também denominada de precisão intra-ensaio, representa o grau de dispersão dos resultados obtidos nas mesmas condições operacionais (ou seja, utilizando o mesmo procedimento de medição, o mesmo operador, equipamento, e no mesmo laboratório) e num intervalo de tempo reduzido (por exemplo, no mesmo dia). O cálculo da dispersão dos resultados obtidos nestas condições foi realizado através da análise de cinco replicados independentes, preparados a partir da fortificação de amostras de sangue branco a duas gamas de concentração (20 ng/mL e 400 ng/mL). Aplicado o método, obtiveram-se as áreas relativas e os TRRs para cada uma das substâncias, em cada replicado, e foi calculada a média, o desvio padrão ( $s$ ) e o coeficiente de variação ( $CV\%$ ), traduzido pela seguinte **equação**:

$$CV\% = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

#### **Equação 9**

Onde:

$s$  – é o desvio padrão;

$\bar{X}$  – é a média dos valores obtidos.

De acordo com os critérios estabelecidos para a repetibilidade do método, o *CV%* deve ser inferior ou igual a 1% para o TRR. No que diz respeito às áreas relativas o *CV%* deve ser inferior ou igual a 15%, para as duas gamas de concentração.

A precisão intermédia, também denominada de precisão inter-ensaio, corresponde à avaliação do grau de dispersão dos resultados obtidos quando contempladas as fontes de variabilidade que simulam o normal funcionamento do laboratório (nomeadamente, diferentes lotes de reagentes, soluções, padrões, curvas de calibração, operadores e operacionalidade do equipamento), pelo que o estudo deste parâmetro recorre à repetição da metodologia analítica, em dias diferentes, durante os quais se verificam estas pequenas alterações. A precisão intermédia foi estudada através da preparação de cinco curvas de calibração preparadas em cinco dias diferentes de acordo com o procedimento descrito no **ponto 3.7.6**. Simultaneamente, com cada curva de calibração, foram preparados controlos positivos a dois níveis de concentração diferentes (20 ng/mL e 400 ng/mL), em triplicado. Uma vez aplicado o procedimento de ensaio, os resultados deste estudo foram tratados por aplicação da ferramenta ANOVA (fator único), através da qual podem ser extraídas, para cada substância e nível de concentração, estimativas da variância da repetibilidade e da precisão intermédia, a partir da aplicação das equações presentes nas **tabelas 5 e 6**.

**Tabela 5** – Tabela ANOVA (fator único).

Fonte	Média quadrática (MQ)	Graus de liberdade
Dentro de grupos	$MS_{run} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{p - 1}$	$p - 1$
Entre grupos	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p(n - 1)}$	$p(n - 1)$
Total		$pn - 1$

Onde  $p$  é o número de sequências de análises para cada nível de concentração (uma sequência para cada dia),  $n$  é o número de replicados em cada sequência,  $x_{ij}$  representa um replicado individual (replicado  $j$ ) obtido na sequência  $i$ ,  $\bar{x}_i$  representa a média de  $n$  replicados obtido na sequência  $i$  e  $\bar{\bar{x}}$  é a média das médias de  $p$  sequências.

**Tabela 6** – Cálculo da estimativa da precisão intermédia.

Precisão	Expressão
Repetibilidade ( $S_r$ )	$S_r = \sqrt{MS_r}$
Between-run precision ( $S_{run}$ )	$S_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}}$
Precisão intermédia ( $S_i$ )	$S_i = \sqrt{(S_r^2) + (S_{run}^2)}$

Uma vez obtidos os valores de  $S_i$ , o critério estabelecido como adequado corresponde à obtenção de um coeficiente de variação ( $CV\%$ ) calculado em condições de precisão intermédia por aplicação da **equação 10**, inferior ou igual a 20% para as duas gamas de concentração.

$$CV\% = \frac{S_i}{\bar{\bar{x}}} \times 100$$

**Equação 10**

### 3.7.8. EXATIDÃO

O estudo da exatidão tem como objetivo investigar a existência de erros sistemáticos nos resultados obtidos a partir do método, definir fatores de correção e, se relevante, estimar a incerteza que lhe está associada. A exatidão é expressa pela recuperação do método, ou seja, a razão entre o valor observado (ou experimental) e o valor esperado (ou teórico). A sua determinação, efetuada em conjunto com a precisão intermédia a partir dos resultados obtidos para os controlos positivos preparados em triplicado, é realizada através do cálculo da

recuperação ( $R_i$ ) de cada nível de concentração para cada dia de trabalho, e a recuperação média ( $\bar{R}$ ) através da aplicação das seguintes **equações**:

$$R_i = \frac{C_{Exp.}}{C_{Teor.}}$$

**Equação 11**

$$\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^p R_i}{p}$$

**Equação 12**

Onde  $p$  corresponde ao número de experiências realizadas.

Através do teste estatístico *t de student*, verifica-se para cada nível de concentração, se a recuperação média é estatisticamente diferente de 100%. Para tal, é calculado o valor de  $t$  experimental ( $t_{Exp.}$ ), para cada nível de concentração, através das seguintes **equações**:

$$t_{Exp.} = \frac{|1 - \bar{R}|}{U_{\%R}}$$

**Equação 13**

$$U_{\%R} = \frac{S_{Exp.}}{\sqrt{p}}$$

**Equação 14**

Onde  $S_{Exp.}$  é o desvio padrão de  $p$  valores de  $R_i$  obtidos em condições de precisão intermédia, sendo  $R_i$  a recuperação média de  $n$  replicados obtidos em condições de repetibilidade.

O valor de  $t_{Exp.}$  é comparado com o valor de  $t$  crítico ( $t_{Crit.}$ ), valor tabelado bi-caudal para  $p - 1$  graus de liberdade, num intervalo de confiança de 95%. Se  $t_{Exp.} \leq t_{Crit.}$ , considera-se

que  $\bar{R}$  não é significativamente diferente de 100%, sendo calculada a incerteza associada à recuperação do método ( $U_{\bar{R}}$ ) através da **equação 15**. Se  $t_{Exp.} > t_{Crit.}$ , então  $\bar{R}$  é significativamente diferente de 100%. Neste caso, a incerteza é aumentada, sendo calculada de acordo com a **equação 16**.

$$U_{\bar{R}} = \frac{U_{\% \bar{R}}}{\bar{R}}$$

**Equação 15**

$$U_{\bar{R}} = \frac{\sqrt{(U_{\% \bar{R}})^2 + \left(\frac{1 - \bar{R}}{K}\right)^2}}{\bar{R}}$$

**Equação 16**

### 3.7.9. ROBUSTEZ

A robustez consiste na capacidade de um método analítico suportar pequenas variações durante a sua realização sem que os resultados se vejam afetados. A análise do impacto das alterações que ocorrem naturalmente foi realizada durante a validação do ensaio, em condições de precisão intermédia, aquando do estudo da precisão e exatidão, no qual foram introduzidas naturalmente pequenas variações no decurso do normal funcionamento do laboratório, nomeadamente, pequenas alterações de pH, temperatura ambiente, composição da fase móvel, lote de reagentes, misturas-padrão, desgaste da coluna cromatográfica e manutenção do equipamento.

### 3.7.10. INTEGRIDADE DA DILUIÇÃO

Devido ao facto de se tratar de uma matriz seca, a técnica de *DBS* não permite que as amostras sejam diluídas diretamente como acontece com as amostras líquidas, pelo que, a abordagem adotada, é a mais comum, e consiste na diluição do extrato das amostras com um extrato obtido

a partir de uma amostra *DBS* branca, ou seja, isenta de qualquer um dos analitos em estudo. Este procedimento foi avaliado para o valor de concentração de 800 ng/mL utilizando um fator de diluição de dois. Para tal, uma amostra branca de sangue foi fortificada com a quantidade adequada das misturas-padrão de modo a obter a concentração final indicada. A partir desta amostra, foram produzidas seis manchas de sangue. Adicionalmente, prepararam-se seis manchas de sangue branco e uma curva de calibração na gama de trabalho (do correspondente LQ a 500 ng/mL). Uma vez secas, todas as *DBS* foram submetidas ao procedimento de extração, secas, redissolvidas e centrifugadas. De seguida, as amostras fortificadas foram transferidas para viais, e a cada uma destas foi adicionado um dos extratos obtidos para as amostras brancas. Após análise, obtiveram-se os valores de concentração para cada uma das substâncias, em cada replicado, foi calculada a média, o desvio padrão ( $s$ ), o coeficiente de variação ( $CV\%$ ) e a exatidão (expressa pela recuperação, ou seja, a razão percentual entre o valor experimental e o valor teórico). De acordo com os critérios estabelecidos, consideraram-se adequados valores de  $CV\%$  inferiores ou iguais a 15% e uma exatidão inferior ou igual a  $\pm 20\%$ .

#### 3.7.11. ESTUDO DA ESTABILIDADE

A técnica de *DBS*, por se tratar de uma matriz seca, pode representar uma forma mais simples, económica e segura de armazenamento das amostras biológicas, e principalmente, pode significar a estabilização de muitos analitos, em alguns casos, mesmo sem a necessidade de recorrer à refrigeração ou congelação das amostras. Várias têm sido as publicações que mostram o aumento significativo da estabilidade dos analitos, ou o retardar do seu processo de degradação, quando se utiliza as *DBS* em comparação com outros meios de armazenamento, nomeadamente, sobre a forma de amostras líquidas, especialmente nos casos em que a instabilidade do composto é provocada pela atividade enzimática. (Alfazil e Anderson, 2008;

Garcia Boy et al., 2008) Contudo, a utilização da técnica de *DBS* por si só não garante a estabilidade para todos os analitos instáveis. Por vezes, são exigidos também cuidados especiais de armazenamento de modo a garantir a estabilidade destes por períodos de tempo mais longos. Neste caso, as três principais abordagens são: (1) o ajuste de temperatura – a utilização de temperaturas de armazenamento mais baixas é muito frequente na estabilização de moléculas pequenas nas amostras *DBS*, uma vez que as reações de degradação (redução, oxidação e hidrólise) são cerca de 10 vezes mais lentas quando a temperatura diminui de 22°C para 0°C; (2) a manutenção da secura das amostras – a presença de água nas amostras *DBS* desempenha um papel crítico nas reações químicas e enzimáticas de hidrólise responsáveis pela clivagem das moléculas, pelo que minimizar o teor de água através da secagem completa do papel de suporte das *DBS*, da mudança de forma regular do excicante e/ou da aplicação de vácuo aos recipientes que contenham as *DBS*, normalmente representa uma boa combinação; e, por último, (3) a alteração da química do papel utilizado – já existem cartões *DBS* quimicamente tratados que estão preparados para, uma vez o sangue em contacto, promover a lise celular, a desnaturação das proteínas evitando o crescimento bacteriano, podendo dessa forma ajudar a estabilizar os analitos instáveis. No entanto, este efeito estabilizador é aparentemente dependente do composto. (Li et al., 2010)

De um modo geral, a estabilidade dos analitos em amostras *DBS*, sob uma ou mais condições diferentes de armazenamento pré-definidas devem ser avaliadas a partir da comparação das concentrações obtidas para os analitos utilizando três replicados de amostras *DBS* a pelo menos duas gamas de concentração (baixa e alta) após vários períodos de armazenamento, com os resultados obtidos a partir de controlos positivos preparados de fresco.



No presente trabalho investigou-se o efeito da temperatura de armazenamento na estabilidade dos analitos em estudo em amostras *DBS* utilizando os cartões Whatman® BFC180, selecionados durante o desenvolvimento e otimização da metodologia. Prepararam-se amostras de sangue fortificadas a dois valores de concentração (20 ng/mL e 400 ng/mL), produziram-se as manchas de sangue, que uma vez secas foram colocadas em envelopes Multi-Barrier da Whatman® nos quais foram introduzidos saquetas individuais de 1 g de um agente excicante para proteger as amostras da humidade, foram divididas em três grupos e armazenadas a três gamas de temperatura diferentes: -10 °C; 2 – 8 °C e temperatura ambiente (eleitas de acordo com as condições disponíveis no laboratório), por um período máximo de aproximadamente oito meses. Durante o período de armazenamento, amostras em triplicado para cada uma das concentrações foram analisadas após 2, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 dias, juntamente com uma curva de calibração e controlos positivos nas mesmas concentrações e em triplicado, preparados de fresco. Uma vez analisadas, as respostas alcançadas para as amostras armazenadas foram comparadas com os valores obtidos para os controlos positivos. Os analitos consideraram-se estáveis quando o valor médio obtido a partir dos três replicados e para cada nível de concentração apresentou uma diferença inferior ou igual a  $\pm 15\%$  relativamente à média apresentada pelo respetivo controlo positivo.

### **3.8. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS/COMPARAÇÃO COM MÉTODOS VALIDADOS EM SANGUE TOTAL**

Uma vez terminada a avaliação dos principais parâmetros de validação, foram analisadas amostras reais de sangue total positivas para as substâncias presentes neste estudo através da técnica de amostragem por *DBS*, a partir de amostras de sangue *post-mortem* e *de vivo*, colhidas no âmbito das atividades forenses do SQTf da Delegação do Sul, do INMLCF, I.P., num total

de 64 amostras, correspondendo a 92 resultados positivos para as substâncias em estudo. Os resultados foram comparados com os obtidos a partir dos métodos para amostras de sangue total utilizados nas análises de rotina do laboratório. Estas metodologias são baseadas em volumes de amostra maiores (500  $\mu$ L), na técnica de *SPE* para a preparação das amostras e na tecnologia *GC-MS* para a sua análise. Juntamente com as amostras (extraídas em duplicado) foi preparado um branco de sangue, uma curva de calibração (do correspondente LQ a 500 ng/mL) e dois controlos positivos preparados também em duplicado com as concentrações de 20 ng/mL e 400 ng/mL para todos os analitos.

A concordância entre os resultados obtidos a partir das *DBS* e das mesmas amostras de sangue total analisadas pelos métodos de análise validados utilizados por rotina no laboratório, foi avaliada através de uma análise de regressão linear, que consiste numa representação gráfica dos resultados obtidos a partir do método de referência *versus* os resultados obtidos através do método em estudo. Contudo, a análise de regressão linear envolve várias premissas que podem não ser cumpridas e levar a resultados enganadores, pelo que, a avaliação da correlação entre dois métodos foi também realizada através do teste-*t* para dados emparelhados (*matched paired t-test*) e da análise de Bland-Altman (que se baseiam na suposição de uma normal distribuição dos dados) (Bland e Altman, 1986; Stockl et al., 1998; Dewitte et al., 2002). Por um lado, o teste-*t* de dados emparelhados permite avaliar a existência de uma diferença média significativa entre dois conjuntos de pares de dados (onde, o limite escolhido para o nível de significância foi de 0,05), enquanto que a análise de Bland-Altman oferece um método simples e gráfico que permite avaliar a concordância entre os dois métodos na quantificação das substâncias, através do cálculo do intervalo dentro do qual a maioria das diferenças entre as medidas obtidas pelos dois métodos estarão incluídas e deste modo poder determinar se este é suficientemente estreito de modo a permitir a substituição do método analítico antigo pelo novo, ou até mesmo utilizar

os dois alternadamente com a garantia que essas diferenças não signifiquem disparidades na interpretação dos resultados. (Bland e Altman, 1986; Redondo et al., 2013) Ou seja, a análise de Bland-Altman consiste na representação gráfica da diferença percentual entre os dois resultados obtidos a partir dos dois processos de medição (eixo dos yy) *versus* a média desses mesmos resultados (eixo dos xx). A média das diferenças entre os resultados obtidos a partir dos dois procedimentos analíticos juntamente com os limites de concordância de 95% (correspondendo a aproximadamente dois desvios padrão da média) é também representado graficamente. A diferença entre os dois métodos e a largura do intervalo definido pelos limites de concordância são então avaliados para determinar se serão aceitáveis. (Bland e Altman, 1986)

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DE ANÁLISE

As condições instrumentais de análise foram otimizadas de modo a alcançar um nível de resposta adequado com a obtenção de picos cromatográficos estreitos e simétricos, uma separação e resolução eficientes das substâncias em estudo, e um tempo de análise curto. O que envolveu a otimização dos parâmetros do detetor, a seleção da fase móvel, da coluna cromatográfica, da temperatura, do fluxo e do gradiente utilizados.

Primeiro procedeu-se à seleção da fase móvel e otimização dos parâmetros da fonte de ionização e do analisador, através da infusão direta no detetor, de misturas-padrão a 10 µg/mL no correspondente solvente orgânico (metanol ou acetonitrilo) que incluíram as substâncias em estudo, em simultâneo com a infusão de cada uma das diferentes fases móveis testadas, procedendo do mesmo modo para os correspondentes padrões internos deuterados. As fases móveis testadas incluíram na sua composição os solventes orgânicos metanol ou acetonitrilo, e solventes aquosos com modificadores de pH, nomeadamente, o ácido fórmico e/ou o formato de amónio utilizados em diversas percentagens/concentrações conferindo uma maior ou menor força à fase móvel correspondente. Deste modo, foi possível selecionar a fase móvel composta pelo acetonitrilo como solvente orgânico e pela solução de formato de amónio 2mM (ácido fórmico 0,1%) como solvente aquoso, otimizar as condições de funcionamento da fonte de ionização, nomeadamente, as voltagens de capilar, do extrator e das RF Lens, a temperatura da fonte e de dessolvatação, os fluxos de gás de dessolvatação e de cone (condições finais descritas no **ponto 3.6.1.**), e ajustar a voltagem de cone individual para cada uma das substâncias, de modo a maximizar a intensidade do correspondente ião molecular protonado (**tabela 3**), obtido a partir do espectrómetro de massa a operar no modo *ESI+*. Uma vez estabelecidos os

parâmetros da fonte de ionização, selecionadas a fase móvel e as voltagens de cone para cada uma das substâncias, otimizaram-se o fluxo de gás de colisão (árgon) e as energias de colisão individuais de modo a maximizar a resposta da fragmentação, e selecionaram-se duas transições iônicas características, resultantes da fragmentação do íon molecular protonado para cada uma das substâncias em estudo e uma transição iônica apenas para os PIs (**tabela 3**).

Posteriormente, procedeu-se à otimização da separação cromatográfica testando as seguintes colunas: Acquity UPLC® BEH C18 (50 mm x 2,1 mm; 1,7  $\mu$ m); Acquity UPLC® HSS T3 (50 mm x 2,1 mm; 1,8  $\mu$ m) e Acquity UPLC® HSS T3 (100 mm x 2,1 mm; 1,8  $\mu$ m) (Waters, Milford, MA, EUA), diferentes temperaturas de coluna (35, 40 e 45°C), fluxos (0,3 a 0,5 mL/min) e gradientes da fase móvel. A coluna e as condições analíticas de temperatura, fluxo e gradiente foram selecionadas de acordo com aquelas para as quais se verificou uma maior eficiência e resolução na separação cromatográfica e melhor formato dos picos, num tempo de análise curto, para a generalidade das substâncias incluídas no presente trabalho (**ponto 3.6.1; tabela 2**).

#### 4.2. PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A extração dos analitos é um passo muito importante na análise quantitativa a partir das amostras *DBS*. A metodologia de extração adotada pode ter um impacto significativo na recuperação e consequentemente nos níveis de sensibilidade obtidos para os analitos, assim como na precisão e exatidão de um determinado ensaio analítico. Existem diversos fatores que podem influenciar significativamente a eficiência da extração, nomeadamente, a origem do sangue analisado (*post-mortem* ou *de vivo*) e as suas propriedades, o tipo de papel dos cartões utilizados, e a idade das manchas de sangue.

De acordo com a literatura (**tabela 1**) existem várias aplicações onde a extração dos analitos envolve a utilização de água ou de soluções tampão aquosas, sendo que, em muitos destes casos, a utilização de uma solução aquosa de extração implica o aumento das interferências devidas aos componentes endógenos da amostra que passam para a solução e consequentemente a necessidade da realização de um procedimento de tratamento adicional de limpeza das amostras, que normalmente consiste na adição de um solvente orgânico para a precipitação de proteínas (Clavijo et al., 2011; Sosnoff et al., 1996), ou para a extração dos analitos do solvente aquoso a partir de um processo de extração líquido-líquido (*LLE*) (Garcia Boy et al., 2008; Jantos et al., 2011), ou ainda num procedimento de extração em fase sólida (nomeadamente, por *SPE*) (Alfazil e Anderson, 2008; Henderson et al., 1993; Saracino et al., 2012; Sausseureau et al. 2012; Schutz et al., 2002). No entanto, a extração dos analitos-alvo também pode ser realizada através da utilização de solventes orgânicos hidrofílicos, tais como o metanol e o acetonitrilo, ou a partir de misturas de solventes orgânicos (Ambach et al., 2013; Antelo-Dominguez et al., 2013; Mercolini et al., 2010; Thomas et al., 2012; Versace et al., 2013). A principal vantagem desta abordagem simples consiste na retenção dos principais componentes do sangue (nomeadamente, proteínas e sais) no papel, enquanto que os analitos-alvo podem ser extraídos da mancha de sangue seco para uma solução para posterior análise. Este tipo de metodologia é, por conseguinte, mais simples e os extratos obtidos são normalmente mais limpos permitindo a sua análise direta sem necessidade de recorrer a passos adicionais de extração/limpeza das amostras.

O objetivo no desenvolvimento do procedimento de preparação das amostras foi a obtenção de um método de pré-tratamento das *DBS* simples e de baixo custo para a extração em simultâneo das drogas de abuso incluídas neste estudo, pelo que a estratégia passou essencialmente por testar diferentes solventes e/ou misturas de solventes orgânicos (que incluíram, o acetato de

etilo, o acetonitrilo, o metanol, o 2-propanol e o tert-butilmetileter) e pontualmente misturas de solventes orgânicos com uma percentagem mínima de água e/ou de um ácido, nomeadamente, o ácido fórmico, utilizando sete tipos diferentes de cartões para amostras *DBS*, que incluíram, o Whatman® 903, BFC 180, FTA DMPK-A, B e C, FTA Elute e Bond Elut DMS.

No que diz respeito à extração dos analitos e limpeza das amostras, os melhores resultados foram obtidos utilizando solventes orgânicos, em particular, para o metanol e para a mistura metanol/acetonitrilo (3:1, v/v), tendo-se optado por esta última, uma vez que, apesar de se terem obtido resultados bastante semelhantes para a maioria das substâncias nos dois casos, observaram-se melhores recuperações para a morfina quando se utilizou a mistura metanol/acetonitrilo (3:1, v/v). Em relação aos cartões, verificou-se que para os Whatman® FTA DMPK-A e FTA Elute não se obtiveram picos cromatográficos para nenhuma das substâncias em estudo, mesmo para as amostras fortificadas após a extração, pelo que a única explicação encontrada foi a presença de algum interferente ao nível da ionização resultando na supressão total do sinal. Relativamente aos cartões Whatman® FTA DMPK-B, os extratos apresentavam uma coloração avermelhada atribuída a um possível arrastamento a partir das manchas de sangue, o que interferia com a análise. De entre os restantes quatro tipos de cartões, obtiveram-se melhores resultados em termos de recuperação dos analitos e de menor presença de resíduos para os cartões Whatman® 903 e BFC 180 em comparação com os Whatman® FTA DMPK-C e Bond Elut DMS.

Utilizando os cartões Whatman® 903 e BFC 180 foram realizadas experiências de otimização das condições de extração dos analitos testando diferentes volumes de solvente (3 e 5 mL), tempos de agitação (20 e 30 min), condições de centrifugação (3500 e 4000 rpm; 10, 20 e 30 min) e a necessidade ou não da utilização de ultrassons. Tendo-se verificado não existirem

diferenças significativas entre os volumes de solvente testados, optou-se por utilizar 3 mL da mistura metanol/acetonitrilo (3:1, v/v). O tempo de agitação no *roller* escolhido foi de 30 min, verificando-se a necessidade de inclusão dos ultrassons (durante cerca de 30 minutos, uma vez que se observou uma melhor eficiência da extração principalmente no caso da morfina e da 6-MAM). Relativamente à centrifugação, as condições consideradas mais adequadas foram a utilização de uma velocidade de 4000 rpm e um tempo de 20 min após os ultrassons e de 10 min após a redissolução do extrato final. Testaram-se ainda diferentes composições do solvente utilizado para a redissolução dos extratos após completa secagem, sendo as condições iniciais da fase móvel (ou seja, solvente B/solvente A (9:1, v/v)) a composição para a qual se obtiveram melhores resultados em relação às áreas, menor presença de resíduos e melhor forma dos picos cromatográficos. E ainda, na preparação das manchas de sangue seco testou-se o tempo mínimo necessário para a secagem das amostras (3 h *versus* durante a noite), observando-se resultados muito semelhantes para todas as substâncias nas duas situações. Contudo, por questões de organização do trabalho e uma vez que o estudo envolve também a utilização de amostras *post-mortem*, caracterizadas por apresentarem uma multivariiedade de condições, nomeadamente, em termos de viscosidade, optou-se por utilizar a secagem durante a noite, em lugar seco, protegido da luz e à temperatura ambiente de modo a garantir a sua secagem completa. Por último, realizou-se uma experiência de comparação entre duas formas possíveis de adição dos PIs, nomeadamente, a sua adição diretamente às manchas de sangue secas (que posteriormente, são submetidas ao processo de extração após 20 min de secagem das amostras) com o objetivo de tentar aproximar o mais possível o comportamento dos PIs aos dos analitos presentes nas amostras, e a adição dos PIs ao solvente de extração (procedimento mais simples e o mais utilizado). Uma vez que não se verificaram diferenças significativas nos resultados obtidos para os dois métodos e para os dois cartões em estudo, optou-se por utilizar a adição dos PIs ao



solvente de extração, uma vez que se trata de um procedimento mais simples e rápido. Contudo, é preciso ter presente que, uma vez que os PIs não são introduzidos na amostra antes do procedimento de extração, estes não permitem corrigir qualquer variabilidade que possa surgir durante o procedimento, pelo que é importante que o mesmo apresente um comportamento o mais uniforme possível independentemente das condições em que seja utilizado, nomeadamente, em termos da sua aplicação a tipos de amostras de sangue e com tempos de armazenagem diferentes, situação que foi tida em consideração durante a validação do procedimento, nomeadamente, na avaliação do parâmetro da eficiência da extração e no estudo da estabilidade dos analitos nos cartões ao longo do tempo.

Apesar de se terem obtido resultados semelhantes para os dois tipos de cartões, durante as experiências realizadas para a otimização das condições de extração, optou-se pelos cartões Whatman® BFC 180, uma vez que estes apresentam uma área útil maior para cada mancha, o que permite a utilização de volumes de sangue superiores ou iguais a 50 µL sem o perigo de sobreposição das manchas. O procedimento de preparação das amostras selecionado encontra-se descrito nos **pontos 3.6.2 e 3.6.3**.

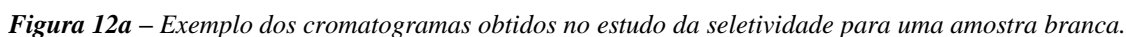
#### **4.3. VALIDAÇÃO**

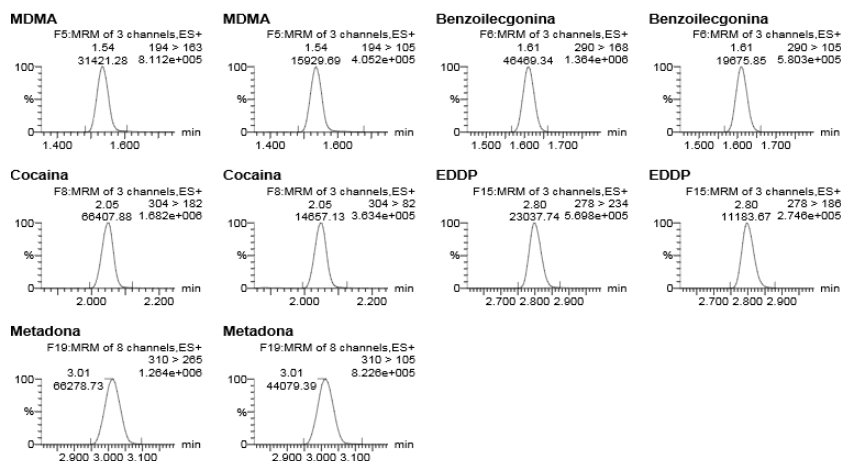
Uma vez estabelecidas as condições analíticas do procedimento de ensaio para a análise de drogas de abuso por *UPLC-MS/MS* a partir de amostras *DBS*, procedeu-se à avaliação dos principais parâmetros de validação do método de acordo com a metodologia apresentada no **ponto 3.7**, cujos resultados obtidos e respetiva discussão são a seguir apresentados.

#### 4.3.1. SELETIVIDADE

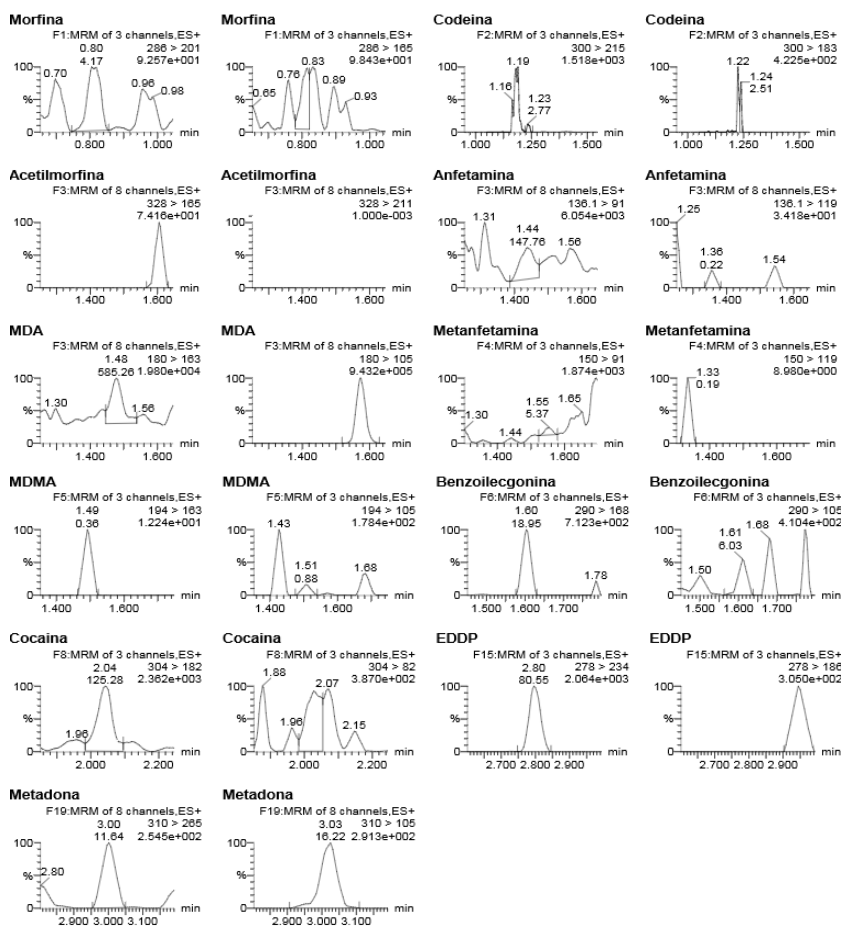
Para verificar a seletividade do método, de acordo com o procedimento descrito no **ponto 3.7.1**, foram analisadas dez *pools* de sangue total formadas por quatro amostras diferentes, preparadas em triplicado. Um primeiro conjunto constituído por amostras isentas dos analitos em estudo; um segundo conjunto que foi fortificado com os analitos e um terceiro conjunto ao qual foram adicionadas 24 substâncias medicamentosas diferentes, com o objetivo de estudar a presença de possíveis interferências. A partir de cada uma das amostras prepararam-se manchas de sangue em duplicado que foram secas e submetidas ao procedimento de extração anteriormente descrito. Uma vez analisadas verificou-se a negatividade e a ausência de interferentes para as amostras isentas dos analitos em estudo e a positividade das amostras fortificadas com as substâncias de interesse por comparação com os resultados obtidos para as amostras controlo preparadas em simultâneo, a partir do cumprimento dos critérios de confirmação qualitativa de substâncias, estabelecido para o tempo de retenção (TR), tempo de retenção relativo (TRR), áreas relativas dos picos diagnóstico (de acordo com os intervalos de tolerância apresentados na **tabela 4**) e para a razão sinal/ruído (S/R) dos picos superior a três (resultados apresentados na **tabela 7**).

Na **figura 12** apresentam-se, a título de exemplo, os cromatogramas obtidos para as substâncias em estudo, a partir da análise de três amostras correspondentes a **(a)** uma *pool* de sangue branco, **(b)** uma *pool* fortificada com os analitos numa concentração de 10 ng/mL e **(c)** uma *pool* de sangue branco contaminada com as 24 substâncias medicamentosas diferentes.





*Figura 12b – Exemplo dos cromatogramas obtidos no estudo da seletividade para uma amostra fortificada com as drogas de abuso (10 ng/mL).*



*Figura 12c – Exemplo dos cromatogramas obtidos no estudo da seletividade para uma amostra de sangue branco para as drogas de abuso, fortificada com 24 substâncias medicamentosas.*

Tabela 7 – Estudo da seletividade para as amostras fortificadas com as drogas de abuso.

**Morfina**

Amostra	TR	TR PI	TRR	$\Delta$ TRR	Area PB	Area ID	A ID/A PB	Int. Tol.	S/R PB	S/R ID
Controlo	0,83	0,83	1,000		951	759	80%	70% - 90%	1799	22183
P1	0,83	0,83	1,000	0,0%	454	350	77%		1327	129
P2	0,83	0,83	1,000	0,0%	610	454	74%		2038	110
P3	0,83	0,83	1,000	0,0%	530	370	70%		303	96
P4	0,83	0,83	1,000	0,0%	611	517	85%		4628	475
P5	0,83	0,83	1,000	0,0%	550	435	79%		169	543
P6	0,83	0,83	1,000	0,0%	262	187	71%		84	65
P7	0,83	0,83	1,000	0,0%	623	492	79%		264	228
P8	0,83	0,83	1,000	0,0%	166	136	82%		55	81
P9	0,83	0,83	1,000	0,0%	319	254	80%		136	418
P10	0,83	0,83	1,000	0,0%	207	166	80%		92	39

**Codeína**

Amostra	TR	TR PI	TRR	$\Delta$ TRR	Area PB	Area ID	A ID/A PB	Int. Tol.	S/R PB	S/R ID
Controlo	1,23	1,23	1,000		5410	2890	53%	43% - 63%	7746	652
P1	1,23	1,23	1,000	0,0%	2471	1369	55%		192	30
P2	1,23	1,23	1,000	0,0%	3351	1821	54%		417	138
P3	1,23	1,23	1,000	0,0%	2663	1578	59%		256	32
P4	1,23	1,23	1,000	0,0%	3435	1823	53%		296	39
P5	1,23	1,23	1,000	0,0%	2290	1246	54%		157	32
P6	1,22	1,22	1,000	0,0%	1573	970	62%		801	94
P7	1,23	1,23	1,000	0,0%	3278	1958	60%		1100	272
P8	1,22	1,22	1,000	0,0%	1470	874	59%		118	33
P9	1,22	1,22	1,000	0,0%	1829	998	55%		432	37
P10	1,22	1,22	1,000	0,0%	1633	947	58%		633	48

**Acetilmorfina**

Amostra	TR	TR PI	TRR	$\Delta$ TRR	Area PB	Area ID	A ID/A PB	Int. Tol.	S/R PB	S/R ID
Controlo	1,38	1,37	1,007		905	841	93%	83% - 103%	116	96
P1	1,38	1,37	1,007	0,0%	3697	3409	92%		1949	5567
P2	1,38	1,37	1,007	0,0%	4221	3624	86%		3624	3137
P3	1,38	1,38	1,000	-0,7%	3218	2698	84%		2776	2210
P4	1,38	1,38	1,000	-0,7%	3366	2788	83%		3290	2638
P5	1,38	1,38	1,000	-0,7%	3757	3232	86%		3051	2802
P6	1,38	1,38	1,000	-0,7%	533	545	102%		404	505
P7	1,38	1,38	1,000	-0,7%	565	571	101%		443	501
P8	1,37	1,37	1,000	-0,7%	160	136	86%		589	442
P9	1,38	1,37	1,007	0,0%	987	821	83%		907	643
P10	1,38	1,37	1,007	0,0%	796	786	99%		907	643

TR – tempo de retenção; TRR – tempo de retenção relativo; PI – padrão interno; PB – pico base; ID – ião diagnóstico;

S/R – razão sinal/ruído.

Tabela 7 – Estudo da seletividade para as amostras fortificadas com as drogas de abuso. (continuação)

**Anfetamina**

Amostra	TR	TR PI	TRR	$\Delta$ TRR	Area PB	Area ID	A ID/A PB	Int. Tol.	S/R PB	S/R ID
Controlo	1,40	1,40	1,000		21525	13077	61%	51% - 71%	261	754
P1	1,41	1,40	1,007	0,7%	10914	7717	71%		173	611
P2	1,41	1,40	1,007	0,7%	12627	7815	62%		229	1003
P3	1,41	1,40	1,007	0,7%	12999	8264	64%		156	494
P4	1,41	1,40	1,007	0,7%	13291	8718	66%		200	666
P5	1,41	1,40	1,007	0,7%	8821	6022	68%		154	447
P6	1,40	1,40	1,000	0,0%	2233	1542	69%		43	125
P7	1,41	1,40	1,007	0,7%	9015	6370	71%		206	1101
P8	1,40	1,40	1,000	0,0%	2304	1601	69%		33	4486
P9	1,40	1,40	1,000	0,0%	4487	3076	69%		47	174
P10	1,40	1,40	1,000	0,0%	2245	1178	52%		23	790

**MDA**

Amostra	TR	TR PI	TRR	$\Delta$ TRR	Area PB	Area ID	A ID/A PB	Int. Tol.	S/R PB	S/R ID
Controlo	1,44	1,52	0,947		43414	13190	30%	22% - 38%	839	18321
P1	1,45	1,53	0,948	0,0%	19131	6564	34%		1008	4627
P2	1,45	1,53	0,948	0,0%	24549	8123	33%		163	5792
P3	1,45	1,53	0,948	0,0%	22571	8334	37%		307	5932
P4	1,45	1,53	0,948	0,0%	26170	8506	33%		810	5699
P5	1,45	1,53	0,948	0,0%	18423	5875	32%		366	4170
P6	1,44	1,53	0,941	-0,7%	8903	3125	35%		428	2198
P7	1,44	1,53	0,941	-0,7%	26725	9261	35%		1199	6170
P8	1,44	1,53	0,941	-0,7%	6827	2597	38%		221	1428
P9	1,44	1,53	0,941	-0,7%	9565	3508	37%		89	2817
P10	1,45	1,53	0,948	0,0%	7409	2212	30%		232	1394

**Metanfetamina**

Amostra	TR	TR PI	TRR	$\Delta$ TRR	Area PB	Area ID	A ID/A PB	Int. Tol.	S/R PB	S/R ID
Controlo	1,51	1,50	1,007		53805	20490	38%	30% - 46%	36727	11675
P1	1,51	1,50	1,007	0,0%	28400	10541	37%		17209	6348
P2	1,51	1,50	1,007	0,0%	36454	14222	39%		21864	8176
P3	1,51	1,50	1,007	0,0%	38484	16170	42%		22358	9985
P4	1,51	1,50	1,007	0,0%	39623	15419	39%		23618	8935
P5	1,51	1,50	1,007	0,0%	25048	10182	41%		15281	6108
P6	1,51	1,50	1,007	0,0%	6171	1952	32%		4197	1280
P7	1,51	1,50	1,007	0,0%	26717	10963	41%		16341	6618
P8	1,51	1,50	1,007	0,0%	6552	2429	37%		3810	1622
P9	1,51	1,50	1,007	0,0%	13489	5212	39%		7626	3101
P10	1,51	1,50	1,007	0,0%	7622	2659	35%		4532	1482

TR – tempo de retenção; TRR – tempo de retenção relativo; PI – padrão interno; PB – pico base; ID – ião diagnóstico;

S/R – razão sinal/ruído.

Tabela 7 – Estudo da seletividade para as amostras fortificadas com as drogas de abuso. (continuação)

**MDMA**

Amostra	TR	TR PI	TRR	$\Delta$ TRR	Area PB	Area ID	A ID/A PB	Int. Tol.	S/R PB	S/R ID
Controlo	1,53	1,52	1,007		55871	25353	45%	36% - 54%	35126	16684
P1	1,54	1,53	1,007	0,0%	24784	10819	44%		16280	7263
P2	1,53	1,53	1,000	-0,7%	28806	14495	50%		19013	9401
P3	1,54	1,53	1,007	0,0%	30267	14947	49%		23162	11501
P4	1,54	1,53	1,007	0,0%	31421	15930	51%		25963	12894
P5	1,53	1,53	1,000	-0,7%	23135	11783	51%		17306	8839
P6	1,53	1,53	1,000	-0,7%	7659	3126	41%		6040	2180
P7	1,53	1,53	1,000	-0,7%	22868	11171	49%		19313	9191
P8	1,53	1,53	1,000	-0,7%	7632	3694	48%		5660	3098
P9	1,53	1,53	1,000	-0,7%	10456	4339	42%		8264	3666
P10	1,53	1,53	1,000	-0,7%	7509	3402	45%		5291	2558

**Benzoilecgonina**

Amostra	TR	TR PI	TRR	$\Delta$ TRR	Area PB	Area ID	A ID/A PB	Int. Tol.	S/R PB	S/R ID
Controlo	1,61	1,61	1,000		65844	31851	48%	38% - 58%	624	520
P1	1,61	1,61	1,000	0,0%	31682	13939	44%		5340	420
P2	1,61	1,61	1,000	0,0%	39236	16556	42%		52952	5232
P3	1,61	1,61	1,000	0,0%	42901	17041	40%		8295	499
P4	1,61	1,61	1,000	0,0%	46469	19676	42%		2551	2900
P5	1,61	1,61	1,000	0,0%	30407	13654	45%		732	85
P6	1,61	1,61	1,000	0,0%	33518	13796	41%		2057	757
P7	1,61	1,61	1,000	0,0%	71917	29344	41%		314	499
P8	1,61	1,61	1,000	0,0%	30171	12875	43%		241	346
P9	1,61	1,61	1,000	0,0%	32341	12510	39%		499	321
P10	1,61	1,61	1,000	0,0%	28879	11622	40%		4009	454

**Cocaína**

Amostra	TR	TR PI	TRR	$\Delta$ TRR	Area PB	Area ID	A ID/A PB	Int. Tol.	S/R PB	S/R ID
Controlo	2,04	2,04	1,000		76628	17952	23%	18% - 28%	17482	2244
P1	2,05	2,05	1,000	0,0%	59149	14037	24%		6133	1593
P2	2,05	2,05	1,000	0,0%	58266	13190	23%		8134	532
P3	2,05	2,05	1,000	0,0%	64133	15076	24%		15365	689
P4	2,05	2,05	1,000	0,0%	66408	14657	22%		4324	3469
P5	2,05	2,05	1,000	0,0%	51514	12295	24%		1882	2711
P6	2,05	2,04	1,005	0,5%	57214	13310	23%		4969	3616
P7	2,04	2,04	1,000	0,0%	62323	14076	23%		2367	9309
P8	2,04	2,04	1,000	0,0%	54045	12504	23%		11451	951
P9	2,04	2,04	1,000	0,0%	60919	12887	21%		7211	5195
P10	2,04	2,04	1,000	0,0%	55719	11891	21%		4207	1831

TR – tempo de retenção; TRR – tempo de retenção relativo; PI – padrão interno; PB – pico base; ID – ião diagnóstico;

S/R – razão sinal/ruído.

**Tabela 7** – Estudo da seletividade para as amostras fortificadas com as drogas de abuso. (continuação)**EDDP**

Amostra	TR	TR PI	TRR	$\Delta$ TRR	Area PB	Area ID	A ID/A PB	Int. Tol.	S/R PB	S/R ID
Controlo	2,79	2,79	1,000		17260	8899	52%	42% - 62%	40211	23010
P1	2,80	2,80	1,000	0,0%	17348	8215	47%		1923	190
P2	2,80	2,80	1,000	0,0%	24194	10826	45%		50457	280
P3	2,80	2,80	1,000	0,0%	20263	9948	49%		52431	300
P4	2,80	2,80	1,000	0,0%	23038	11184	49%		7258	755
P5	2,80	2,79	1,004	0,4%	19053	9751	51%		13064	311
P6	2,80	2,79	1,004	0,4%	7518	3331	44%		4813	526
P7	2,80	2,79	1,004	0,4%	18141	9603	53%		39145	2475
P8	2,79	2,79	1,000	0,0%	7948	3361	42%		389	507
P9	2,79	2,79	1,000	0,0%	10313	5470	53%		2106	189
P10	2,79	2,79	1,000	0,0%	8690	4137	48%		2783	72

**Metadona**

Amostra	TR	TR PI	TRR	$\Delta$ TRR	Area PB	Area ID	A ID/A PB	Int. Tol.	S/R PB	S/R ID
Controlo	3,00	3,00	1,000		115179	82442	72%	62% - 82%	7037	5059
P1	3,01	3,01	1,000	0,0%	66072	44776	68%		4070	2735
P2	3,01	3,00	1,003	0,3%	71761	47816	67%		4590	2932
P3	3,01	3,01	1,000	0,0%	58383	45847	79%		3526	2860
P4	3,01	3,01	1,000	0,0%	66279	44079	67%		4018	2645
P5	3,01	3,00	1,003	0,3%	58929	43408	74%		3674	2686
P6	3,01	3,00	1,003	0,3%	58954	40257	68%		3709	2441
P7	3,00	3,00	1,000	0,0%	144048	92023	64%		8879	5649
P8	3,00	3,00	1,000	0,0%	62299	42247	68%		3871	2639
P9	3,00	3,00	1,000	0,0%	68248	47342	69%		4274	2899
P10	3,01	3,00	1,003	0,3%	56324	44164	78%		3506	2736

TR – tempo de retenção; TRR – tempo de retenção relativo; PI – padrão interno; PB – pico base; ID – ião diagnóstico;

S/R – razão sinal/ruído.

De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras de sangue fortificadas com os analitos cumpriram os critérios de positividade anteriormente referidos, com uma percentagem de falsos negativos de 0%. Relativamente às amostras brancas para os analitos-alvo não se observou a presença de interferentes, pelo que se obteve uma percentagem de falsos positivos de 0%. Assim sendo, o procedimento cumpriu os critérios de aceitação estabelecidos pelo SQTF e referidos no **ponto 3.7.1** e considerou-se que a seletividade do método ficou demonstrada.



## 4.3.2. EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO

A eficiência da extração foi avaliada de acordo com o procedimento descrito no **ponto 3.7.2** para dois valores de concentração (20 ng/mL e 200 ng/mL). Os resultados obtidos encontram-se na tabela seguinte:

**Tabela 8** – Recuperação média (%) da fase de extração para cada uma das substâncias em estudo para dois níveis de concentração (20 ng/mL e 200 ng/mL).

Substância	Recuperação média (%) $\pm$ CV(%)	
	20 ng/mL	200 ng/mL
Morfina	61 $\pm$ 4,4	51 $\pm$ 5,3
Codeína	85 $\pm$ 4,9	79 $\pm$ 5,9
Acetilmorfina	42 $\pm$ 4,1	50 $\pm$ 9,8
Anfetamina	80 $\pm$ 4,5	85 $\pm$ 5,9
MDA	85 $\pm$ 3,1	83 $\pm$ 5,6
Metanfetamina	89 $\pm$ 6,8	87 $\pm$ 9,9
MDMA	84 $\pm$ 5,5	86 $\pm$ 9,1
Benzoilecgonina	91 $\pm$ 6,3	89 $\pm$ 3,3
Cocaína	80 $\pm$ 4,1	90 $\pm$ 7,0
EDDP	69 $\pm$ 1,0	67 $\pm$ 6,3
Metadona	81 $\pm$ 6,0	82 $\pm$ 8,2

O estudo da eficiência da extração permitiu concluir que todas as substâncias em estudo cumprem os critérios estabelecidos pelo SQTf apresentando percentagens de recuperação entre os 42% e os 91%. Os valores obtidos para os dois valores de concentração foram sempre superiores ou iguais 79%, para todas as substâncias, com exceção da morfina, acetilmorfina e EDDP, para as quais a recuperação apresentou valores entre 42% e 69%. Durante o

desenvolvimento da metodologia foram testadas diferentes condições, na tentativa de melhorar a recuperação destes analitos das *DBS*, nomeadamente, diferentes composições para o solvente de extração, ou a introdução de outras técnicas como a sonicação, sem nunca esquecer o objetivo de obtenção de um procedimento de pré-tratamento das amostras simples e de baixo custo para a extração em simultâneo das drogas de abuso incluídas neste estudo. Em comparação com metodologias anteriormente publicadas, verifica-se que os resultados obtidos são semelhantes para a generalidade das substâncias e nos casos em que se observa uma maior recuperação de determinados analitos a partir de métodos apresentados em publicações anteriores, verificou-se que estas tiveram que recorrer a procedimentos de pré-tratamento mais complexos e morosos, normalmente, recorrendo primeiro à reconstituição da mancha de sangue utilizando um tampão/solução aquosa e posteriormente a um procedimento adicional de extração/limpeza da amostra, é o caso das metodologias apresentadas por Clavijo et al., 2011, Garcia Boy et al., 2008 e por Sausseureau et al., 2012 para a 6-MAM e morfina (ver **tabela 1**).

Importa ainda referir que, devido às propriedades físico-químicas dos cartões/papel utilizados nas *DBS*, alguns analitos podem permanecer na superfície quando presentes em concentrações mais baixas e permear a mancha quando em concentrações elevadas promovendo a sua adsorção ativa sobre o papel, o que associado a uma difusão incompleta do solvente de extração nas camadas mais interiores da mancha, pode resultar numa menor eficácia da extração para níveis de concentração mais elevados, e o fenómeno inverso, ou seja, uma recuperação superior para concentrações inferiores, no caso de o método de extração se revelar inadequado. (van der Heijden et al., 2009) Uma vez que, no presente trabalho se observaram níveis de recuperação muito semelhantes para ambos os valores de concentração para a generalidade das substâncias, considerou-se que o procedimento de extração mostrou ter um comportamento semelhante, independentemente da concentração do analito presente na amostra.

#### 4.3.3. ARRASTAMENTO

O estudo da existência de fenómenos de arrastamento foi efetuado em conjunto com o estudo da eficiência da extração de acordo com o protocolo descrito no **ponto 3.7.3**. A partir da análise dos cromatogramas obtidos para as amostras brancas injetadas entre as amostras correspondentes à concentração mais elevada (200 ng/mL), foi possível concluir que não existem fenómenos de arrastamento para nenhuma das substâncias na gama de concentrações estudada, uma vez que não se verificou a presença de qualquer pico cromatográfico associado a uma possível contaminação.

#### 4.3.4. EFEITO DE MATRIZ

Tal como referido anteriormente, a coeluição cromatográfica de componentes da matriz biológica com os analitos de interesse, pode interferir no processo de ionização das moléculas resultando na supressão ou intensificação do seu sinal analítico. Este fenómeno, designado por efeito de matriz, foi avaliado através de duas experiências distintas. A primeira foi realizada em simultâneo com as amostras preparadas para o estudo da eficiência da extração, com o objetivo de estudar a variabilidade em função da concentração do analito, e a segunda experiência consistiu na seleção de dez amostras de sangue de origens diferentes e estudar a variabilidade deste fenómeno em função da matriz dentro do mesmo tipo de matriz biológica. Estas experiências foram realizadas de acordo com as metodologias mencionadas no **ponto 3.7.4**. Os resultados obtidos para o estudo do efeito da matriz a dois valores de concentração diferentes (20 e 200 ng/mL) numa mesma matriz e utilizando matrizes de origem diferente (a um valor de concentração correspondente a 20 ng/mL) encontram-se nas **tabelas 9 e 10**, respetivamente.

**Tabela 9** – Efeito de matriz em função do valor de concentração.

Substância	Efeito de Matriz (%)			
	Conc. 20 ng/mL	CV (%)	Conc. 200 ng/mL	CV (%)
Morfina	-24	10	-23	6,6
Codeína	5	3,5	-2	0,9
6-Monoacetilmorfina	-17	4,1	-9	9,0
Anfetamina	7	12	14	2,7
MDA	6	4,2	4	2,5
Metanfetamina	-18	11	-1	6,7
MDMA	-10	5,9	-9	4,7
Benzoilecgonina	14	2,7	4	5,0
Cocaína	-12	5,3	-10	4,3
EDDP	-56	13	-47	9,4
Metadona	-10	8,1	-3	5,1

De acordo com os resultados obtidos para o estudo do efeito de matriz em função da concentração (**tabela 9**) verificou-se que não se observaram efeitos de matriz significativos para a generalidade das substâncias para os dois valores de concentração, com exceção do EDDP para a qual se observou uma supressão considerável do sinal, com valores semelhantes para as duas gamas de concentração. Contudo, deve-se ter em atenção que esta experiência foi realizada utilizando apenas uma fonte de sangue total. Da análise dos resultados obtidos a partir da segunda experiência para o estudo do efeito de matriz para diferentes matrizes (**tabela 10**), verifica-se de um modo geral que se confirmam os resultados obtidos na primeira experiência,

**Tabela 10** – Efeito de matriz em função de dez matrizes diferentes.

Substância	Efeito de Matriz (%)										Média	CV(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Morfina	-43	-35	-39	-52	-24	-42	-21	-51	-21	-33	<b>-36</b>	18
Codeína	-4	6	8	0	10	9	9	1	8	6	<b>6</b>	4
6-Monoacetilmorfina	0	-2	-5	-6	1	-14	-8	-2	-5	-13	<b>-5</b>	5
Anfetamina	-14	-10	11	-17	1	4	-1	-12	-1	15	<b>-2</b>	11
MDA	-18	16	22	38	18	33	29	15	26	37	<b>22</b>	13
Metanfetamina	-11	4	2	3	-4	3	-4	10	11	2	<b>2</b>	6
MDMA	-8	0	-4	-12	-1	-8	4	-3	-8	-11	<b>-5</b>	6
Benzoilecgonina	15	12	-1	12	11	10	-5	-2	-6	-3	<b>4</b>	8
Cocaína	-10	-2	-5	-9	-17	-14	-18	-18	-15	-15	<b>-12</b>	6
EDDP	-40	-53	-45	-51	-57	-50	-47	-4	-35	-40	<b>-42</b>	26
Metadona	6	-1	0	6	-2	-2	-6	-3	8	-1	<b>0</b>	5

ou seja, efeitos de matriz não significativos para a generalidade das substâncias com exceção do EDDP, e neste caso, verifica-se também um ligeiro incremento da supressão do sinal para a morfina. Importa ainda referir, que nestes dois casos, assim como para a maioria das substâncias presentes neste estudo, foi introduzido um análogo deuterado como padrão interno, o que permite corrigir as variações que possam resultar da presença de efeitos de matriz.

#### 4.3.5. LIMITE DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

De acordo com o procedimento descrito no **ponto 3.7.5** os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para cada analito foram obtidos a partir de um conjunto de quatro valores de concentração (0,5; 1; 2 e 5 ng/mL), seleccionados na região estimada do LD e do LQ, através da avaliação do cumprimento dos critérios de identificação estabelecidos relativamente ao

TRR, às relações iônicas dos íons e à correspondente razão S/R. Para o LQ determinou-se ainda o CV% e o E%, cujos valores devem ser inferiores a 20%. Os resultados obtidos relativamente a cada um dos critérios de identificação, precisão e de exatidão para os limites de detecção e quantificação selecionados para cada uma das substâncias incluídas neste estudo encontram-se no **anexo A**, apresentando-se na **tabela 11** apenas o resumo dos principais resultados, nomeadamente, os valores adotados para o LD, o LQ e o correspondente CV% e E%, para cada uma das substâncias.

**Tabela 11** – Resultados obtidos para o LD e LQ.

Substância	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	CV(%)	E(%)
Morfina	1	5	5,6	1,9
Codeína	1	2	4,9	6,3
6-Monoacetilmorfina	5	5	9,0	1,0
Anfetamina	1	2	12	7,8
MDA	2	2	13	4,3
eMetanfetamina	0,5	2	5,5	12
MDMA	0,5	1	6,9	7,6
Benzoilecgonina	0,5	1	6,3	13
Cocaína	0,5	1	9,8	12
EDDP	0,5	5	9,9	0,32
Metadona	0,5	2	2,5	7,9

A partir dos resultados apresentados no **anexo A** e na **tabela anterior** é possível confirmar que os valores de LD e LQ selecionados cumprem os critérios de identificação e os critérios estabelecidos para o CV% e para o E%, para todas as substâncias, apresentando valores entre 2,5% e 13%, e entre 0,32% e 13%, respetivamente. Importa também referir, que, tendo em

conta a gama de trabalho do método e o intervalo de concentrações esperado nas amostras reais, considerou-se que os valores selecionados para o LD e LQ são adequados.

Comparativamente com metodologias anteriormente publicadas por outros autores, os valores de LD e LQ obtidos no presente trabalho são, na grande maioria, melhores, porque inferiores, para todas as substâncias. É o caso de Alfazil e Anderson que apresentaram um método para a análise e preservação de substâncias instáveis em amostras *DBS*, o qual incluiu benzodiazepinas e a cocaína por *LC-MS/MS* obtendo para esta última, um LD de 0,74 ng/100 µL e um LQ de 2,46 ng/100 µL. (Alfazil e Anderson, 2008) Garcia Boy et al. desenvolveram um método para a determinação de morfina e 6-MAM por *LC-MS/MS*, tendo alcançado valores para o LD de 0,4 ng e 0,8 ng/100 µL e para o LQ de 1,4 ng e 2,7 ng/100 µL, respetivamente. (Garcia Boy et al., 2008) Henderson et al. publicaram um trabalho para a análise de benzoilecgonina onde obtiveram um LD de 5 ng/mL e um LQ de 10 ng/mL. Por seu turno, Langel et al., desenvolveram uma metodologia para a determinação de 23 substâncias que incluíram as drogas de abuso: anfetamina, cocaína, codeína, MDA, MDMA, metadona, metanfetamina e morfina com limites de quantificação de 10 – 50 ng/mL, e Schutz et al. publicaram um método de triagem e deteção simultânea de 14 substâncias, entre as quais se incluem: a anfetamina, a benzoilecgonina, a cocaína, a codeína, o MDA, o MDMA, a metanfetamina e a morfina com limites de deteção de 1,62 – 4,91 ng/50 µL, valores francamente superiores aos obtidos no presente trabalho. Contudo importa referir, que em qualquer um destes casos, foi utilizada a análise por *GC-MS*, uma tecnologia reconhecidamente menos sensível do que a utilizada neste estudo. (Henderson et al., 1993; Langel et al., 2011; Schutz et al., 2002) Por outro lado, Mercolini et al. desenvolveram um método para a determinação de cocaína e seus principais metabolitos utilizando a técnica de HPLC acoplado a um detetor de fluorescência, alcançando valores de LD e LQ de 7 ng/mL e 20 ng/mL, respetivamente. Saracino et al., apresentaram um

método para a análise de metadona em pacientes no contexto da monitorização terapêutica por *HPLC* acoplado a um detetor colorimétrico, tendo obtido para o LD um valor de 1,2 ng/mL e para o LQ de 4 ng/mL. (Mercolini et al., 2010; Saracino et al., 2012) Existem igualmente metodologias publicadas que apresentam valores para os limites de deteção e/ou quantificação superiores ou semelhantes aos apresentados neste trabalho, porém nestes verifica-se que as análises envolvem a utilização de um menor volume de sangue, é o caso de Sosnoff et al., que desenvolveram um método para a análise de benzoilecgonina alcançando um LD de 2 ng/mL e um LQ de 4 – 5 ng/mL a partir de uma perfuração de 6 mm da *DBS* correspondendo a um volume aproximado de 12 µL de sangue. (Sosnoff et al., 1996) Do método desenvolvido por Ambach et al. para a triagem de 64 novas drogas psicoativas que inclui a anfetamina, a metanfetamina, o MDA e o MDMA os valores de LD apresentados situam-se entre 1 – 5 ng/mL utilizando 10 µL de sangue. Lauer et al. publicaram um método para a triagem e semi-quantificação de 90 substâncias que incluíram, analgésicos, antidepressivos, benzodiazepinas, neurolépticos e drogas de abuso, nomeadamente, anfetamina, benzoilecgonina, cocaína, MDA, MDMA, metadona, metanfetamina e opiáceos com valores de LD entre 1 – 10 ng/mL a partir de um volume de amostra correspondente a 5 µL. E ainda, Versace et al., que desenvolveram um método de análise de 22 substâncias que incluiu as drogas de abuso: anfetamina, benzoilecgonina, cocaína, codeína, 6-MAM, MDMA, metanfetamina, metadona e morfina, utilizando um procedimento de dessorção das *DBS online* a partir de um volume de amostra de 5 µL, obtendo valores de LD < 1 – 100 ng/mL. Nestes três últimos trabalhos foi utilizada a mesma tecnologia *LC-MS/MS*, um Qtrap 5500 da ABSciex, equipamento caracterizado por apresentar uma elevada sensibilidade, permitindo a análise de volumes muito reduzidos de amostra. (Ambach et al., 2013; Lauer et al., 2011; Versace et al., 2013) Jantos et al., publicaram um método para a análise de MDMA e MDA no contexto da condução sob a influência de



drogas, onde os limites de detecção e quantificação foram de 1,6 ng/mL e 5,7 ng/mL, e de 0,12 ng/mL e 0,4 ng/mL, respetivamente, verificando-se que no caso do MDA os valores são inferiores aos apresentados neste trabalho, contudo importa referir que o volume de sangue utilizado foi superior (100 µL). (Jantos et al., 2011) Por último, Clavijo et al. desenvolveram uma metodologia para a análise de morfina onde obtiveram valores de LD e LQ de 0,25 ng/mL e 1 ng/mL, respetivamente, a partir de um volume de sangue aproximado de 20 µL, e Thomas et al. publicaram um método essencialmente qualitativo para a análise de 26 substâncias com interesse no contexto do controlo da dopagem, entre as quais se encontram a cocaína, MDA e MDMA e onde se obtiveram valores de LD de 0,05 – 0,5 ng/mL e de LQ de 0,25 ng/mL (apenas para a cocaína) a partir de 20 µL de sangue. Em ambos os trabalhos os valores apresentados são inferiores aos obtidos para as mesmas substâncias neste trabalho, contudo importa referir que em qualquer um destes trabalhos foi utilizada uma técnica analítica mais sensível, um *LC-MS/MS* API 5000 e um equipamento de alta resolução, um *UHPLC-Orbitrap (Q exactive mass spectrometer)*, respetivamente. (Clavijo et al., 2011; Thomas et al., 2012)

#### 4.3.6. LINEARIDADE/MODELO DE CALIBRAÇÃO

O estudo da linearidade e seleção do modelo de calibração mais adequado para cada uma das substâncias presentes neste trabalho foi realizado a partir da aplicação do procedimento descrito no **ponto 3.7.6**. Foram utilizados diferentes fatores de ponderação sendo considerado como o mais adequado aquele cujo valor resultante do somatório dos erros relativos percentuais ( $\sum ER\%$ ) dos diferentes calibradores era menor, e que garantia um coeficiente de correlação ( $r^2$ ) superior a 0,99. Os resultados obtidos relativamente ao *ER%* e ao  $r^2$  para cada uma das curvas de calibração produzidas em cinco dias diferentes, utilizando os diferentes fatores de ponderação e para cada uma das substâncias, encontram-se no **anexo B**, apresentando-se na

**tabela 12** apenas o resumo dos principais resultados, nomeadamente, o fator de ponderação selecionado, e os correspondentes valores do  $\sum ER\%$  e da média do  $r^2$  para cada uma das substâncias.

**Tabela 12** – Estudo da linearidade e modelo de calibração (melhor fator de ponderação, somatório dos erros relativos percentuais ( $\sum ER\%$ ) e média do coeficiente de correlação ( $r^2$ )).

Substância	Fator de ponderação	$\sum ER\%$	$r^2$ (média)
Morfina	$1/x$	264	0,9968
Codeína	$1/x$	352	0,9986
6-Monoacetilmorfina	$1/x$	193	0,9965
Anfetamina	$1/x$	368	0,9959
MDA	$1/x$	593	0,9940
eMetanfetamina	$1/x$	376	0,9978
MDMA	$1/x$	356	0,9976
Benzoilecgonina	$1/x$	464	0,9955
Cocaína	$1/x$	418	0,9968
EDDP	$1/x$	392	0,9960
Metadona	$1/x$	376	0,9977

A avaliação do coeficiente de correlação e do desvio percentual da concentração calculada da concentração nominal para cada uma das substâncias indicaram que o modelo de regressão linear ponderada  $1/x$  foi o modelo mais adequado, apresentando a melhor combinação de resultados para os cinco dias testados.

#### 4.3.7. REPETIBILIDADE, PRECISÃO INTERMÉDIA E EXATIDÃO

A precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e a exatidão foram avaliadas de acordo com os procedimentos descritos nos **pontos 3.7.7 e 3.7.8**. A repetibilidade (ou precisão intra-ensaio) consistiu no cálculo da dispersão dos resultados obtidos nas mesmas condições operacionais através da análise de cinco replicados independentes a dois valores de concentração (20 ng/mL e 400 ng/mL). Uma vez analisadas as amostras, obtiveram-se as áreas relativas e os TRRs para cada uma das substâncias, em cada replicado, e foi calculada a média, o desvio padrão ( $s$ ) e o coeficiente de variação ( $CV\%$ ), resultados que se encontram no **anexo C**, apresentando-se na **tabela 13** apenas os resultados principais relativos ao  $CV\%$ . Relativamente à precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) e exatidão, foram avaliados através da preparação de curvas de calibração em conjunto com controlos positivos preparados em triplicado, a duas concentrações (20 ng/mL e 400 ng/mL), em cinco dias diferentes. Uma vez aplicado o procedimento de ensaio, os resultados obtidos para os valores de concentração para as amostras controlo foram tratados por aplicação das expressões constantes do tratamento estatístico presente nos **pontos 3.7.7 e 3.7.8**. Os resultados obtidos para cada uma das substâncias a partir das expressões aplicadas no tratamento estatístico encontram-se nos **anexos D e E**, apresentando-se na **tabela 13** apenas os resultados obtidos para o  $CV\%$ , no caso da precisão intermédia, e os valores de *Bias*, ou seja, a diferença da recuperação média do método ( $\bar{R}$ ) em relação ao valor teórico e do  $t_{Exp.}$ , para a exatidão.

De acordo com os valores de  $CV\%$  apresentados na **tabela 13** para a repetibilidade do método, os critérios estabelecidos, de um  $CV\%$  inferior ou igual a 1% para o TRR e inferior ou igual a 15% para as áreas relativas ( $A/A_{PI}$ ) para as duas gamas de concentração, foram respeitados por

**Tabela 13** – Estudo da repetibilidade (CV%), precisão intermédia (CV%) e exatidão (Bias).

Substância	Conc. Teór.	Conc. Exp.	Prec. Inter.	Exatidão		Repetibil. CV (%)	
	(ng/mL)	(ng/mL)	CV(%)	Bias	$t_{Exp.}$	TRR	A/A <sub>PI</sub>
Morfina	20	19,6	5,9	-1,8	0,94	0,00	4,3
	400	387,2	5,3	-3,2	2,31	0,00	7,4
Codeína	20	19,9	4,7	-0,6	0,45	0,36	3,4
	400	388,7	6,4	-2,8	1,66	0,45	6,9
6-Monoacetilmorfina	20	18,7	12	-6,5	1,42	0,00	8,0
	400	406,8	10	1,7	0,46	0,33	8,5
Anfetamina	20	21,0	7,8	4,9	2,04	0,00	14
	400	376,6	9,2	-5,9	2,28	0,32	9,9
MDA	20	21,6	8,8	7,9	2,59	0,31	9,7
	400	372,3	12	-6,9	1,65	0,38	12
Metanfetamina	20	21,0	7,0	4,9	2,24	0,00	11
	400	394,4	7,6	-1,4	0,63	0,00	13
MDMA	20	20,6	8,9	2,9	0,92	0,00	7,7
	400	391,6	10	-2,1	0,54	0,00	6,8
Benzoilecgonina	20	20,2	13	0,8	0,15	0,00	14
	400	371,1	12	-7,2	1,62	0,44	14
Cocaína	20	18,5	10	-7,7	2,67	0,00	3,8
	400	369,7	8,5	-7,6	2,77	0,00	6,7
EDDP	20	19,3	8,1	-3,5	1,58	0,00	8,9
	400	362,9	10	-9,3	2,66	0,00	12
Metadona	20	20,6	6,3	3,1	1,25	0,15	8,1
	400	391,5	6,3	-2,1	0,97	0,15	5,0

todas as substâncias, tendo-se obtido um  $CV\% \leq 0,45$  para o TRR e entre 3,4% e 14% para A/A<sub>PI</sub>. No que diz respeito à precisão intermédia obtiveram-se valores de  $CV\%$  entre 4,7% e 13% para todas as substâncias e nas duas gamas de concentração, cumprindo deste modo o critério estabelecido de um coeficiente de variação inferior ou igual a 20%. Relativamente à exatidão, expressa através do valor de *Bias*, verifica-se que os valores obtidos (entre -9,3% e 7,9%) se encontram dentro do intervalo considerado aceitável, de  $\pm 20\%$ . Importa ainda referir que, de acordo com o teste estatístico *t* de *student*, é possível afirmar que todas as substâncias estudadas apresentaram recuperações médias não estatisticamente diferentes de 100%, uma vez que comparando os valores obtidos para o  $t_{Exp.}$ , se verifica que são sempre inferiores ao  $t_{Crit.}$  (valor tabelado bi-caudal para  $p - 1$  graus de liberdade, num intervalo de confiança de 95%, a que corresponde o valor de 2,78).

#### 4.3.8. ROBUSTEZ

A avaliação da robustez pretende demonstrar que o método analítico consegue suportar pequenas variações que podem ocorrer naturalmente sem que os resultados de precisão e exatidão sejam significativamente afetados. Este parâmetro foi avaliado durante a validação, nomeadamente, aquando do estudo da precisão e exatidão, nos quais foram naturalmente incluídas as alterações referidas no **ponto 3.7.9**, tendo-se verificado que o método manteve a sua capacidade de confirmação qualitativa de todas as substâncias em estudo, assim como não se observaram alterações significativas na precisão e exatidão do método que possam ser atribuídas às modificações introduzidas.

## 4.3.9. INTEGRIDADE DA DILUIÇÃO

O método adotado para a diluição das amostras *DBS* foi avaliado através da aplicação do procedimento descrito no **ponto 3.7.10**, utilizando um valor de concentração de 800 ng/mL e um fator de diluição de dois. Após a análise das amostras, obtiveram-se os valores de concentração para cada replicado e calcularam-se a média, o desvio padrão (*s*), o coeficiente de variação (*CV%*) e a exatidão (expressa pela recuperação, *R%*). Os resultados encontram-se na **tabela 14**.

Tabela 14 – Estudo da integridade da diluição.

Substância							D.Pad.		C.Final		
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Média	(s)	CV(%)	(ng/mL)	R (%)
Morfina	377	380	382	379	380	393	<b>382</b>	5,71	<b>1,5</b>	764	<b>95</b>
Codeína	368	361	362	367	371	380	<b>368</b>	6,90	<b>1,9</b>	736	<b>92</b>
6-MAM	391	387	384	405	386	415	<b>394</b>	12,4	<b>3,1</b>	789	<b>99</b>
Anfetamina	350	343	358	340	327	345	<b>344</b>	10,6	<b>3,1</b>	688	<b>86</b>
MDA	338	323	328	319	327	327	<b>327</b>	6,30	<b>1,9</b>	654	<b>82</b>
Metanfetamina	342	331	313	309	340	339	<b>329</b>	14,4	<b>4,4</b>	658	<b>82</b>
MDMA	392	374	361	387	371	371	<b>376</b>	11,6	<b>3,1</b>	752	<b>94</b>
Benzoilecgonina	385	373	365	372	374	380	<b>375</b>	6,81	<b>1,8</b>	750	<b>94</b>
Cocaína	417	436	389	405	391	407	<b>407</b>	17,3	<b>4,2</b>	815	<b>102</b>
EDDP	340	378	349	347	351	327	<b>349</b>	16,8	<b>4,8</b>	698	<b>87</b>
Metadona	389	375	344	358	383	375	<b>371</b>	16,6	<b>4,5</b>	741	<b>93</b>

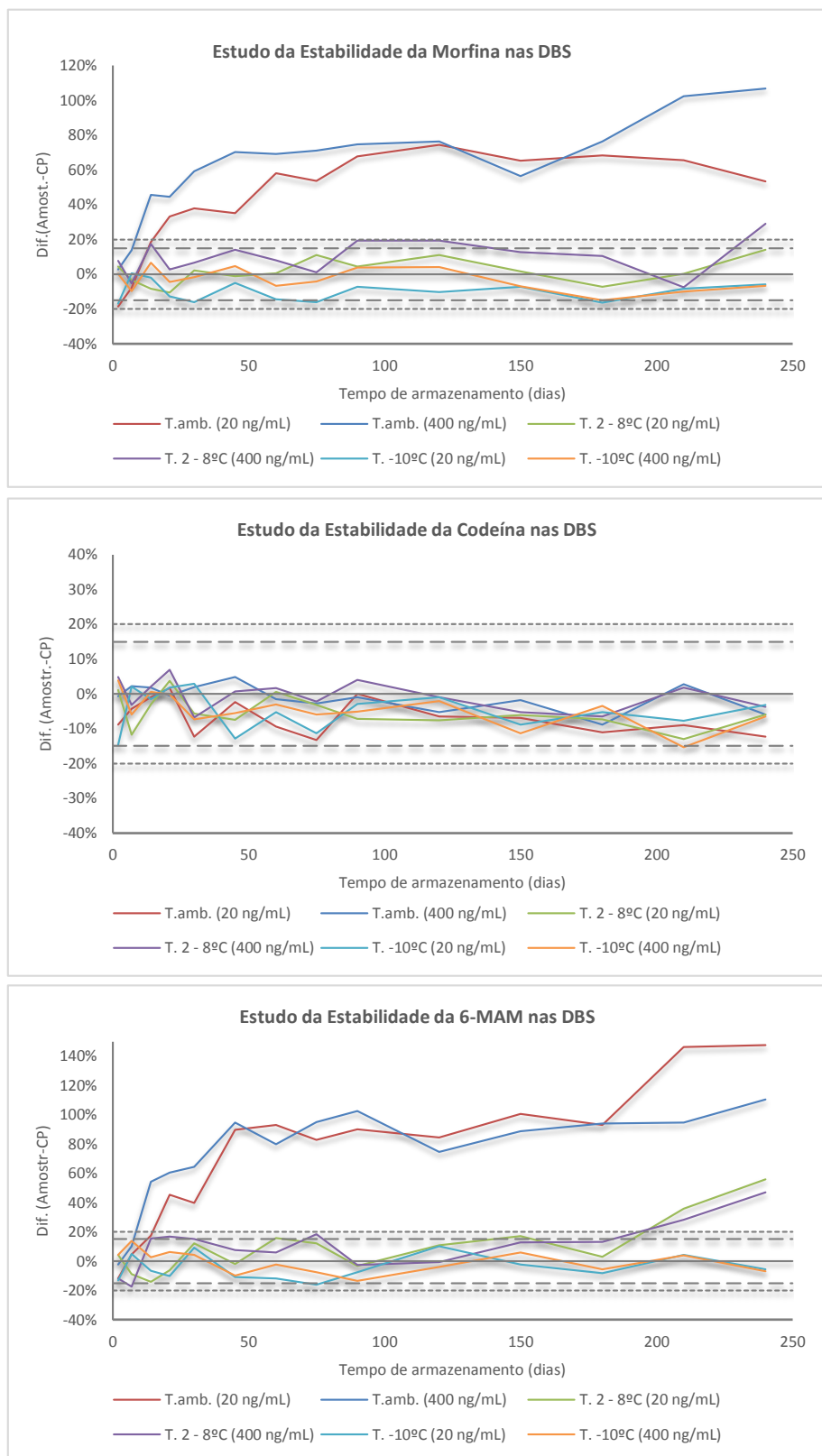
De acordo com a tabela anterior considerou-se que o procedimento utilizado para a diluição das amostras *DBS* é adequado apresentando valores para o *CV%* entre 1,5% e 4,8% e para o *R%*

entre 82% e 102%, respeitando os critérios estabelecidos de um valor inferior ou igual a 15% para a precisão e de  $\pm 20\%$  para a exatidão.

#### 4.3.10. ESTUDO DA ESTABILIDADE

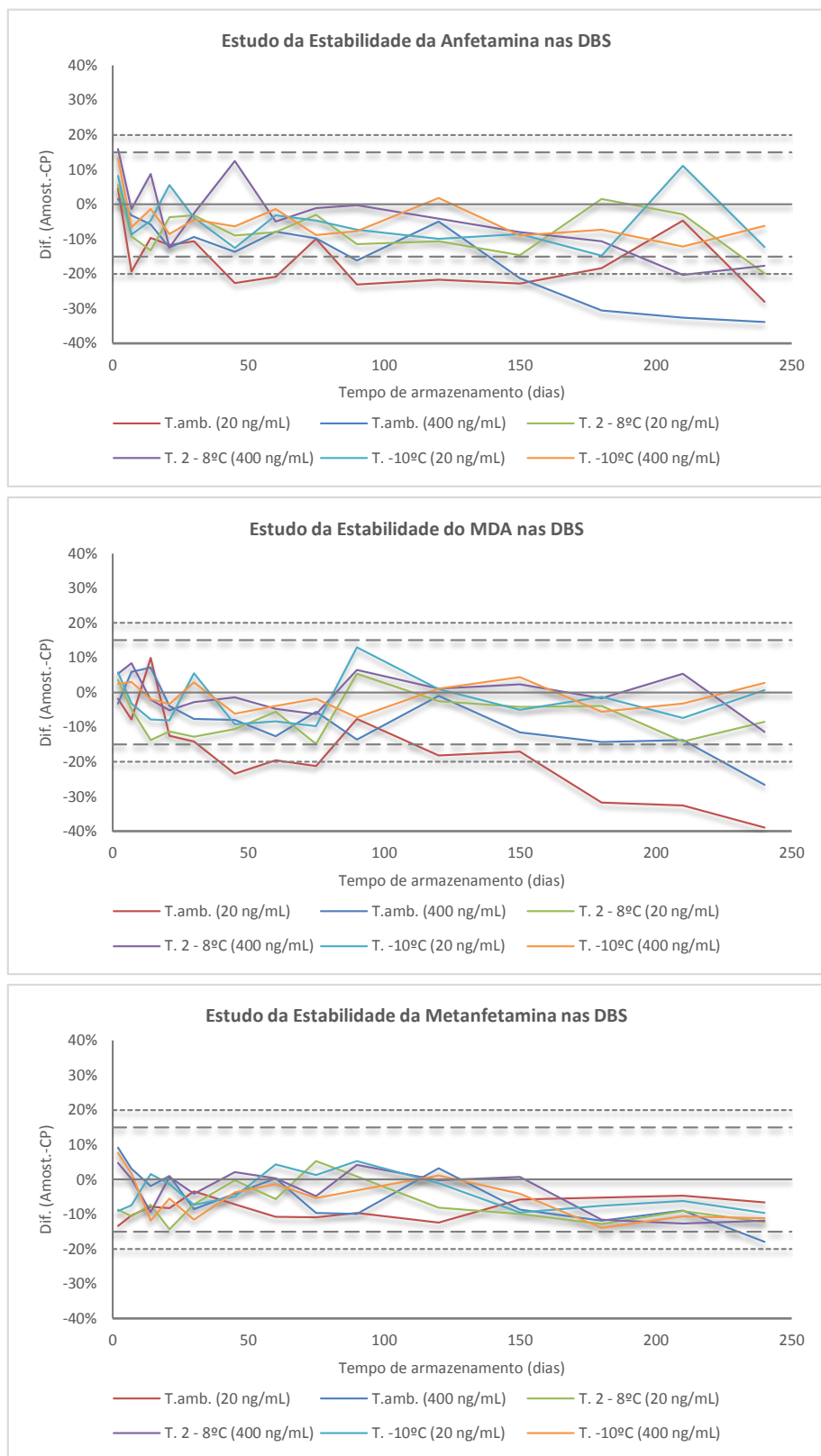
O estudo do efeito da temperatura de armazenamento na estabilidade dos analitos nas *DBS* foi realizado seguindo o protocolo descrito no **ponto 3.7.11**. Durante o período de armazenamento (a  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $2 - 8^{\circ}\text{C}$  e Temp.Amb.) foram analisadas amostras em triplicado para cada uma das concentrações (20 ng/mL e 400 ng/mL) após 2, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 dias, juntamente com uma curva de calibração (preparada na gama de trabalho, LQ – 500 ng/mL) e controlos positivos nas mesmas concentrações e também em triplicado, preparados em cada um dos dias. Uma vez analisadas, os resultados obtidos para as amostras armazenadas foram comparados com os valores obtidos para os controlos positivos. Na **figura 13** encontra-se a representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos para a concentração nas amostras armazenadas e os valores obtidos para os correspondentes controlos positivos, em função do tempo de armazenamento para as duas gamas de concentração, para cada uma das substâncias e para as três temperaturas seleccionadas neste estudo.

Considerou-se que os analitos são estáveis nas *DBS* a uma determinada temperatura, quando a diferença entre o valor médio obtido para os três replicados, para cada uma das concentrações utilizadas, e a média obtida para o respetivo controlo positivo foi inferior ou igual a  $\pm 15\%$ . Nos gráficos apresentados na **figura 13** foram desenhadas linhas a tracejado correspondentes a uma diferença percentual de  $\pm 15\%$  e de  $\pm 20\%$ , por forma a melhor visualizar o cumprimento ou não dos analitos do critério estabelecido.

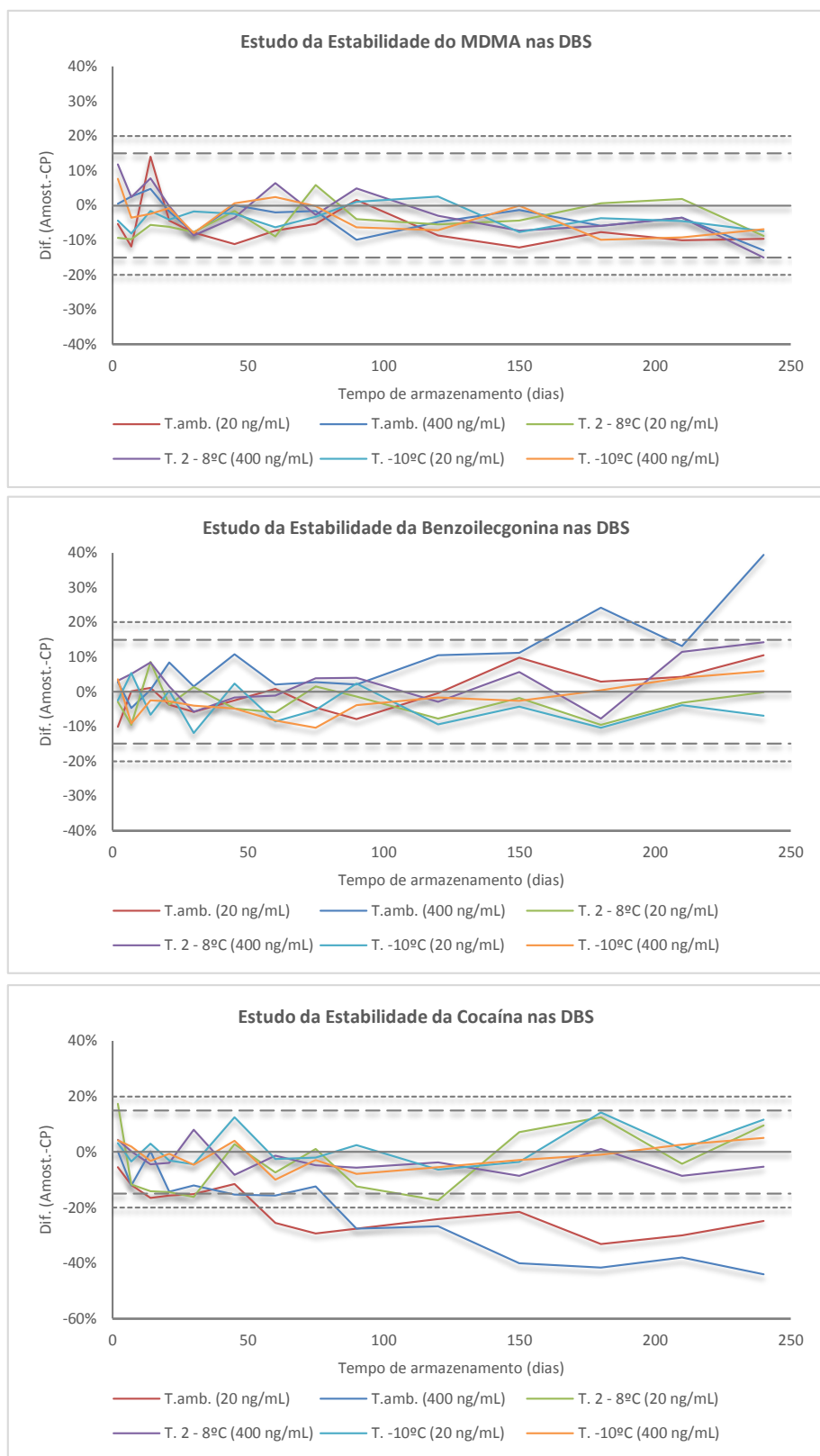


**Figura 13a** – Representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos para as amostras e os controlos positivos para as três temperaturas de armazenamento (T.amb; 2 – 8°C e -10°C) para a morfina, codeína e 6-monoacetilmorfina.

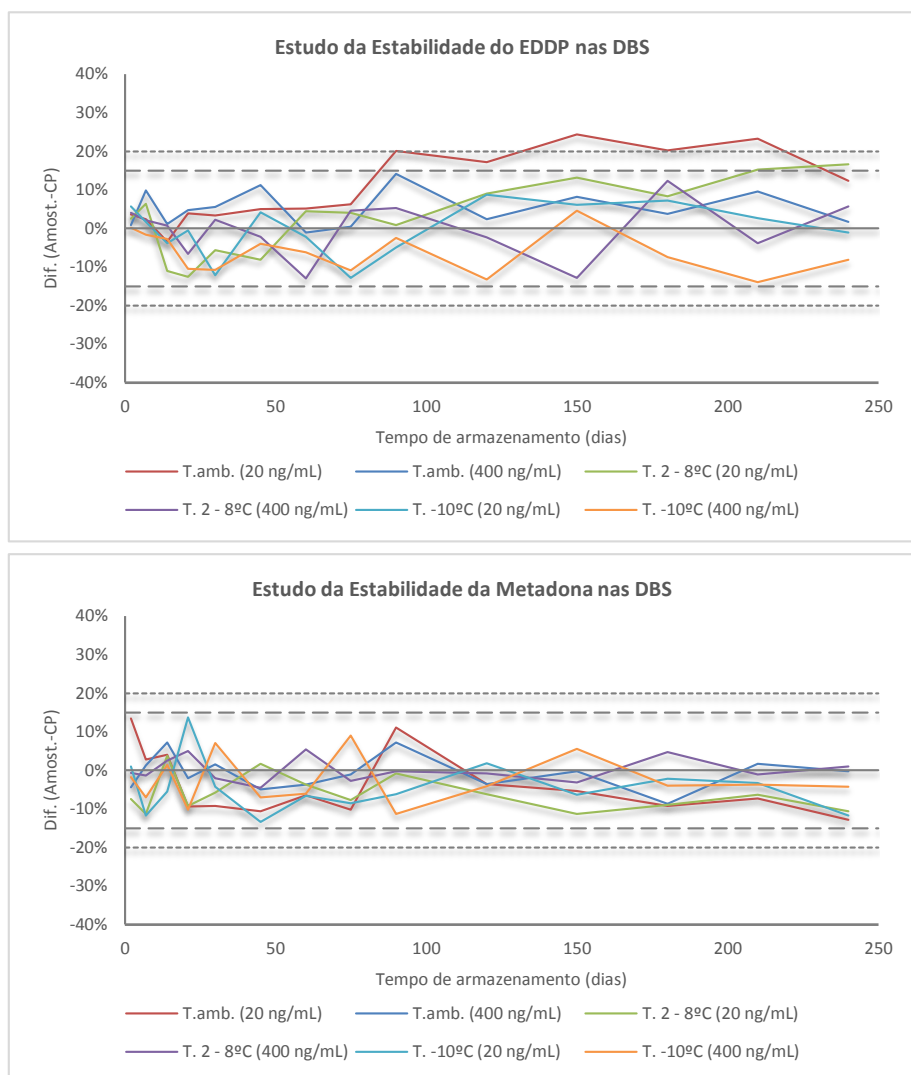




**Figura 13b** – Representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos para as amostras e os controlos positivos para as três temperaturas de armazenamento (T.amb; 2 – 8°C e -10°C) para a anfetamina, o MDA e a metanfetamina.



**Figura 13c** – Representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos para as amostras e os controlos positivos para as três temperaturas de armazenamento (T.amb; 2 – 8°C e -10°C) para o MDMA, a benzoilecgonina e a cocaína.



**Figura 13d** – Representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos para as amostras e os controlos positivos para as três temperaturas de armazenamento (T.amb; 2 – 8°C e -10°C) para o EDDP e a metadona.

Na **tabela 15** apresentam-se os valores obtidos para a diferença percentual entre as amostras DBS e o correspondente controlo positivo após um período de armazenamento de oito meses, para os dois valores de concentração e nas três gamas de temperatura seleccionadas.

De acordo com os gráficos apresentados na **figura 13** e os valores da **tabela 15** é possível comprovar que a temperatura de armazenamento que apresenta os melhores resultados de estabilidade para a generalidade das substâncias estudadas é a -10°C, uma vez que para esta

**Tabela 15** – Diferença percentual entre as amostras armazenadas e o correspondente controle positivo, no estudo da estabilidade após o armazenamento das drogas de abuso incluídas neste estudo, em amostras DBS por um período de 8 meses (aprox.), a dois valores de concentração (20 ng/mL e 400 ng/mL) e a três gamas de temperatura (Temp., 2 – 8°C e -10°C).

Substância	Temp. Amb.		2 – 8°C		- 10°C	
	20 ng/mL	400 ng/mL	20 ng/mL	400 ng/mL	20 ng/mL	400 ng/mL
Morfina	53%	107%	14%	29%	-6%	-7%
Codeína	-12%	-6%	-6%	-4%	-3%	-7%
6-MAM	148%	110%	56%	47%	-5%	-7%
Anfetamina	-28%	-34%	-20%	-18%	-12%	-6%
MDA	-39%	-27%	-8%	-11%	1%	3%
Metanfetamina	-7%	-18%	-12%	-12%	-10%	-11%
MDMA	-10%	-13%	-9%	-15%	-7%	-7%
Benzoilecgonina	10%	39%	0%	14%	-7%	6%
Cocaína	-25%	-44%	10%	-5%	12%	5%
EDDP	12%	2%	17%	6%	-1%	-8%
Metadona	-13%	0%	-11%	1%	-12%	-4%

temperatura todas as substâncias respeitam o critério estabelecido (de uma diferença percentual inferior ou igual a  $\pm 15\%$ ) para os dois valores de concentração ao longo de todo o período de armazenamento, sendo que, para a codeína, metanfetamina, MDMA e metadona, verifica-se a estabilidade ao longo de todo o período de armazenamento, qualquer que seja a temperatura utilizada e o valor de concentração nas amostras. Resultados, que no caso da metadona estão em concordância com o trabalho apresentado por Saracino et al., que incluiu o estudo da estabilidade desta substância nas DBS por um período de armazenamento de um mês à temperatura ambiente apresentando uma diminuição na concentração da metadona de 8,3%.

(Saracino et al., 2012) Para o seu metabolito, o EDDP, de acordo com os resultados apresentados, verifica-se que poderá haver uma ligeira instabilidade das amostras armazenadas à temperatura ambiente, situação revelada apenas nas amostras a uma concentração de 20 ng/mL onde se registaram para alguns dias alterações na concentração no máximo de 24%, contudo, de um modo geral, pode-se concluir que também para esta substância não se verificam alterações muito significativas das concentrações, cumprindo na maior parte dos casos o critério estabelecido para as três temperaturas de armazenamento estudadas. Sausserieau et al., publicaram um trabalho onde avaliaram a estabilidade a longo prazo para um conjunto de drogas de abuso nas *DBS* que incluiu a codeína, metanfetamina e MDMA, cujos resultados para o armazenamento a -20°C por um período de 6 meses concordam com os apresentados neste estudo. Porém, no que se refere aos resultados para uma temperatura de armazenamento de 4°C, estas substâncias mostraram possuir alguma instabilidade apresentando decréscimos na concentração na ordem dos 20%, 40 – 50% e 25 – 30%, respetivamente, após um período de armazenamento de 6 meses. (Sausserieau et al, 2012) Resultados que contrariam os obtidos neste estudo, no qual as concentrações não sofreram alterações significativas mesmo quando armazenadas à temperatura ambiente por um período de 8 meses. Por outro lado, Ambach et al. publicaram um método para a triagem de 64 substâncias psicoativas entre as quais se encontram a metanfetamina e o MDMA, e onde incluíram um estudo cujo resultado confirma a estabilidade destas substâncias quando armazenadas por um período de 2 semanas, tanto à temperatura ambiente, como a 4°C. (Ambach et al., 2013)

No caso da morfina e 6-MAM observa-se um aumento muito significativo do valor de concentração para as amostras armazenadas à temperatura ambiente, a partir da segunda semana de armazenamento. Para as amostras a uma temperatura entre 2 – 8°C, a 6-MAM apresenta igualmente uma tendência para o aumento do valor de concentração após cinco meses de

armazenamento. O incremento da concentração nestes casos apenas é justificado com o facto de, eventualmente, se verificarem alterações da matriz que possam refletir-se numa modificação do comportamento destas substâncias durante o procedimento de preparação das amostras, nomeadamente, o aumento da eficiência da extração em função do tempo de armazenamento (uma vez que estas são as substâncias que apresentam a menor recuperação, com valores entre 51% e 61% para a morfina e entre 42% e 50% para a 6-MAM). Estas alterações na matriz são significativamente mais pronunciadas nas amostras armazenadas à temperatura ambiente, em muito menor grau nas amostras armazenadas refrigeradas entre 2 – 8°C, e não se verificam no caso das amostras a -10°C, por um período mínimo de 8 meses. É do conhecimento geral que a 6-MAM (um metabolito da heroína cuja deteção permite confirmar o seu consumo ilícito) apresenta instabilidade elevada quando preservada em amostras de sangue total a qualquer temperatura de armazenamento superior a -20°C, transformando-se rapidamente em morfina, um metabolito que surge igualmente do consumo de substâncias prescritas, como seja, a codeína. De acordo com estudos anteriores, a utilização das *DBS* apresenta um efeito estabilizador da 6-MAM. Garcia Boy et al., confirmaram este efeito no estudo de estabilidade que apresentaram para a morfina e 6-MAM, onde concluíram que, se por um lado, a morfina não evidencia sinais significativos de degradação tanto em amostras líquidas como nas *DBS* a qualquer valor de temperatura utilizado (-20°C, 4°C e 40°C) e pelo período de 7 dias, por outro, a 6-MAM mostrou ser estável a -20°C, tanto em amostras de sangue total como nas *DBS*, sendo que, se degrada muito mais rapidamente em solução do que nas amostras secas quando armazenadas a temperaturas mais elevadas, desaparecendo totalmente das amostras de sangue total a 40°C, não sendo possível a sua deteção após 5 dias, enquanto que nas amostras *DBS* foi possível obter ainda um valor de 50% da concentração inicial, verificando-se a mesma tendência para as amostras armazenadas a 4°C. (Garcia Boy et al., 2008) Por outro lado, no

estudo publicado por Sausseareau et al., onde se incluiu a morfina, concluíram que, após um período de armazenamento de 6 meses, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , as concentrações não se alteraram mais do que  $\pm 15\%$ . Contudo, após 6 meses de armazenamento a  $4^{\circ}\text{C}$ , a morfina sofreu um decréscimo significativo da concentração, apresentado um resultado de apenas 65% do valor inicial. Comparando estes resultados com os do presente trabalho, parece não haver concordância, uma vez que, neste último caso, o valor de concentração cumpre praticamente o critério estabelecido para as amostras armazenadas a uma temperatura de  $2 - 8^{\circ}\text{C}$  durante quase todo o tempo em que decorreu o estudo e para os dois valores de concentração. Contudo, é importante ter em atenção, que no trabalho apresentado por Sausseareau et al. a morfina apresenta uma eficiência de extração de 90%, valor superior ao obtido no presente trabalho de 51% a 61%, pelo que uma alteração da eficiência da extração com o aumento da recuperação no caso da morfina, como já foi referido anteriormente, pode justificar a inversão da tendência de degradação desta substância, observada por Sausseareau et al., nas *DBS* armazenadas a uma temperatura de refrigeração. (Sausseareau et al., 2012)

De acordo com os resultados, tanto a anfetamina como o MDA, apresentam uma ligeira tendência de degradação com o tempo para as amostras *DBS* armazenadas à temperatura ambiente, com um decréscimo da concentração na ordem dos 30% aproximadamente, após os 6 a 8 meses de armazenamento. Para as temperaturas de refrigeração ( $2 - 8^{\circ}\text{C}$ ) e de congelação ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) não se observam alterações significativas das concentrações, cumprindo-se sempre o critério estabelecido como correspondente a um comportamento estável. Comparando estes resultados com os do trabalho publicado por Sausseareau et al., verifica-se que, apesar de se observar a concordância dos resultados obtidos para as amostras armazenadas a uma temperatura de congelação (seja a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-10^{\circ}\text{C}$ ), o mesmo já não se confirma para as amostras armazenadas a uma temperatura de refrigeração, uma vez que segundo este autor a

anfetamina e o MDA mostraram ter um comportamento instável apresentando um decréscimo da concentração de cerca de 40% e de 30%, respetivamente, para as amostras *DBS* armazenadas a 4°C. (Saussereau et al., 2012)

A cocaína é conhecida por ser uma substância instável em amostras de sangue total devido à presença de ligações éster na sua estrutura, que sofrem rapidamente reações de hidrólise enzimática e química. Processo que é mais facilmente reduzido ou minimizado nas amostras conservadas secas, como é o caso das *DBS*. No presente trabalho, a cocaína apresentou um decréscimo superior a 15% da concentração inicial após 45 dias de armazenamento à temperatura ambiente, chegando a atingir um valor de -33% e de -44% da concentração inicial, para as concentrações de 20 ng/mL e 400 ng/mL, respetivamente, ao longo dos 8 meses de armazenamento. Para as outras gamas de temperatura, não se verificaram alterações significativas para os valores de concentração durante todo o período de armazenamento, sendo que os resultados mais estáveis se registaram para a temperatura de -10°C. Por outro lado, o seu metabolito, a benzoilecgonina, apresenta uma tendência para um ligeiro incremento da concentração, que se torna mais evidente apenas a partir dos 5 meses de armazenamento para as amostras à temperatura ambiente e no caso das *DBS* a uma concentração mais elevada (400 ng/mL). Aumento esse que se atribui à possível transformação da cocaína em benzoilecgonina, que se poderá manifestar em maior percentagem nestas condições de armazenamento. Para as amostras armazenadas a 2 – 8°C e a -10°C, a benzoilecgonina apresenta um comportamento estável durante todo o período de tempo estudado, à semelhança do que acontece para a cocaína. Henderson et al. publicaram um trabalho onde observaram um aumento significativo da quantidade de benzoilecgonina presente numa amostra de sangue total fortificada com cocaína, logo após um período de incubação de 12h a 45°C, enquanto que, para as amostras armazenadas nas *DBS*, e sujeitas à incubação nas mesmas condições de temperatura, após 108h a degradação

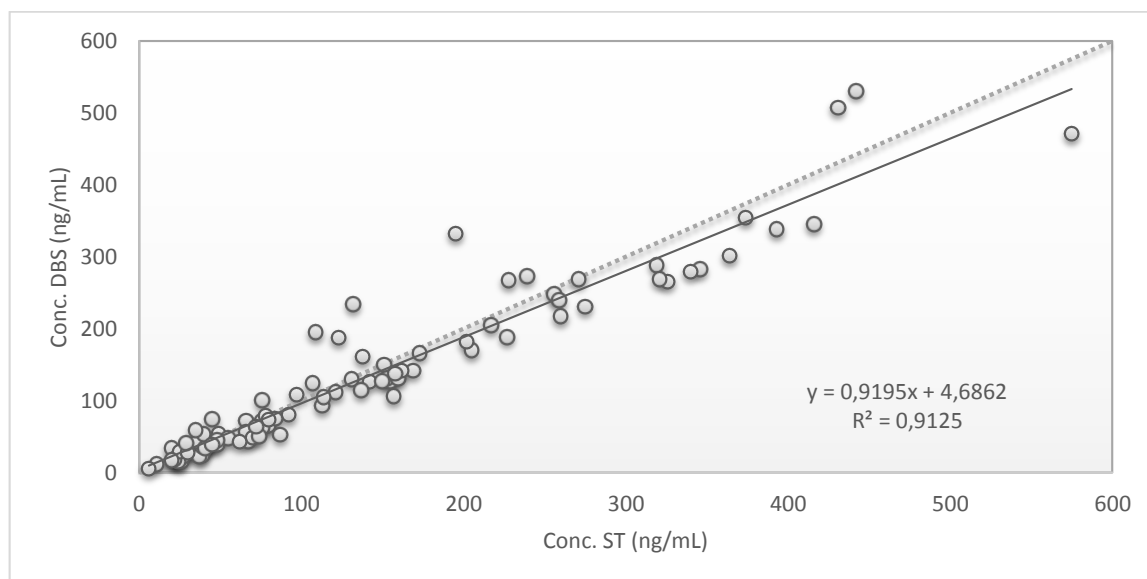


registada foi mínima, não tendo sido possível detetar a presença de benzoilecgonina em concentrações quantificáveis. Demonstrando deste modo que as reações enzimáticas necessárias à conversão da cocaína em benzoilecgonina são retardadas quando o sangue é armazenado em papel de filtro e mantido desidratado à semelhança de uma amostra liofilizada. (Henderson et al., 1993) Alfazil e Anderson apresentaram um estudo sobre a estabilidade em amostras *DBS*, para algumas benzodiazepinas e para a cocaína, substâncias conhecidas pela sua instabilidade devido à presença de grupos funcionais amida e éster nas suas estruturas químicas, durante um período de armazenamento de um mês e a três temperaturas diferentes (temperatura ambiente, 4°C e -20°C), onde concluíram que a cocaína apresenta um comportamento estável a -20°C, um ligeiro decréscimo da concentração após um mês de armazenamento à temperatura de refrigeração com -11% da concentração inicial, e uma maior instabilidade à temperatura ambiente com um decréscimo da concentração de cerca de 20%. (Alfazil e Anderson, 2008) Por último, Saussereau et al. avaliaram a estabilidade a longo prazo da cocaína e seus metabolitos nas *DBS*, tendo concluído que após 6 meses de armazenamento a -20°C a concentração da cocaína sofreu um decréscimo inferior a 20%. Contudo, para as amostras a 4°C observou-se um decréscimo de 55% em relação à concentração inicial, concluindo que as amostras de cocaína em *DBS* devem ser armazenadas a temperaturas de congelação. Por outro lado, para a benzoilecgonina não obtiveram qualquer alteração significativa do valor de concentração após seis meses de armazenamento e às duas temperaturas estudadas. (Saussereau et al., 2012) Resultados que, de um modo geral, concordam com os obtidos no presente trabalho, principalmente no que diz respeito aos obtidos para as amostras conservadas a temperaturas de congelação.

#### 4.4. ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS/COMPARAÇÃO COM MÉTODOS VALIDADOS EM SANGUE TOTAL

Após concluída a validação, o método desenvolvido para a análise de drogas de abuso em amostras *DBS* foi aplicado a 64 amostras de sangue (*de vivo* e *post-mortem*) colhidas no âmbito das atividades forenses da Delegação do Sul do INMLCF, IP, correspondendo a um total de 92 resultados positivos para as substâncias em estudo: 6-monoacetilmorfina (1); anfetamina (4); benzoilecgonina (24); cocaína (7); codeína (6); EDDP (3); MDA (4); MDMA (8); metadona (5); metanfetamina (1) e morfina (29). Uma vez analisadas as amostras, os resultados obtidos foram comparados com os dados adquiridos a partir dos métodos de análise para amostras de sangue total validados e utilizados por rotina no SQTf (a compilação dos resultados por amostra relativos às substâncias presentes, a sua concentração obtida a partir dos dois métodos e a diferença percentual encontram-se no **anexo F**). O protocolo adotado para a análise das amostras reais, assim como o tratamento estatístico utilizado para a avaliação dos resultados obtidos encontra-se no **ponto 3.8**. Tal como descrito neste ponto, a comparação entre os resultados obtidos a partir das duas metodologias foi realizada através de uma análise de regressão linear, para além da aplicação do teste-*t* para dados emparelhados (*matched paired t test*) e da representação gráfica de Bland-Altman.

Na **figura 14** encontra-se a representação gráfica da análise de regressão linear entre os resultados obtidos para a concentração utilizando os métodos de rotina baseados na técnica de *SPE-GC/MS* versus os resultados obtidos através a técnica de *DBS-UPLC-MS/MS*, para o conjunto das substâncias incluídas neste estudo. Tendo-se obtido um coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,912 e um declive de 0,9195.



**Figura 14** – Representação gráfica da análise da regressão linear entre os dados adquiridos a partir dos métodos de referência versus os resultados obtidos através do método em estudo (a linha a tracejado representa a igualdade entre resultados; a linha contínua corresponde ao resultado da regressão linear cuja equação e coeficiente de correlação encontram-se na figura)

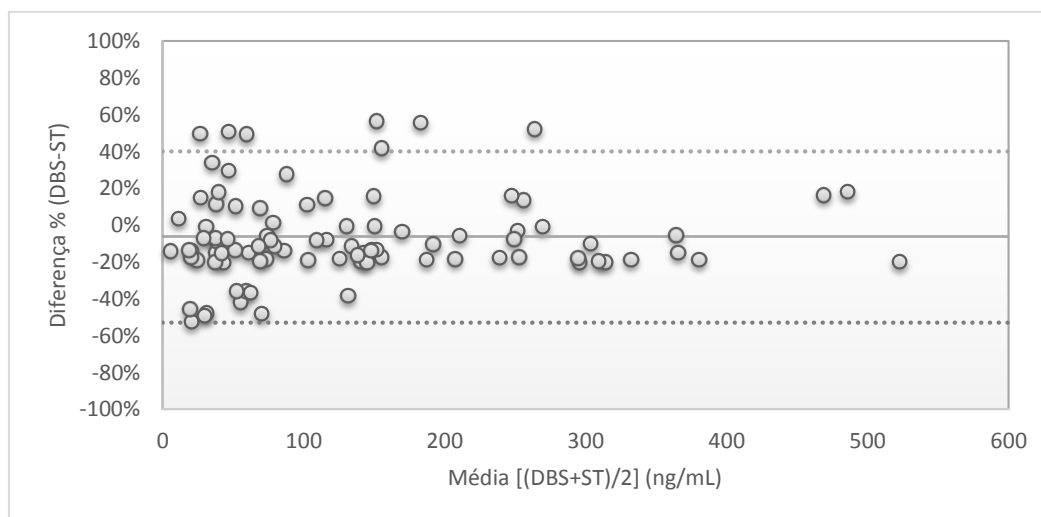
Os resultados consideraram-se bastante positivos tendo em conta o facto de se tratarem de amostras biológicas de elevada inter-variabilidade, como são tipicamente as amostras colhidas no âmbito das atividades forenses, seja pelo tipo de amostra (*de vivo* ou *post-mortem*), seja pelas condições em que foi feita a colheita e o tempo que decorreu entre esta e o início das análises. Acresce o facto de se ter decidido incluir no mesmo tratamento os resultados obtidos para todas as substâncias, uma vez que não foi possível a obtenção de um número representativo de amostras positivas que permitisse fazê-lo individualmente, o que poderá significar que um eventual mau desempenho de uma determinada substância terá necessariamente um impacto negativo no resultado obtido para o conjunto de todas as substâncias.

Adicionalmente, foi aplicado o teste-*t* para dados emparelhados utilizando o procedimento descrito e as expressões constantes no **anexo G**, com o objetivo de avaliar a existência de uma

diferença significativa entre os dois métodos utilizados para a determinação das drogas de abuso incluídas neste estudo. O valor de  $t$  calculado foi de 1,764, ou seja, inferior ao  $t$  tabelado para uma distribuição bi-caudal e um nível de significância de 0,05, cujo valor é de 1,987. Assim, de acordo com este teste, não se consideram significativas as diferenças obtidas entre o método utilizado por rotina na análise de amostras de sangue total por *SPE-GC/MS* e as mesmas amostras analisadas por *DBS-UPLC-MS/MS*.

Para além destes testes, foi ainda realizada a análise de Bland-Altman. Considerando uma distribuição normal das diferenças, calcularam-se: a média da diferença dos métodos, o desvio padrão ( $s$ ), e os limites de concordância de 95% (que definem um intervalo de valores dentro do qual se encontrarão a maioria das diferenças entre as medidas obtidas a partir dos dois métodos, e que correspondem a aproximadamente dois desvios padrão da média, mais concretamente,  $M \pm 1,96 \times s$ ). (Bland e Altman, 1986) Na **figura 15** encontra-se a representação gráfica resultante da análise de Bland-Altman, onde se apresenta a diferença percentual dos resultados obtidos a partir dos dois métodos (no eixo dos yy) *versus* a média dos dois valores (no eixo dos xx), uma vez que se considera ser esta a melhor estimativa do valor verdadeiro. A diferença percentual média entre os dois métodos foi de -6,2%, com limites de concordância de -53% e 40%.

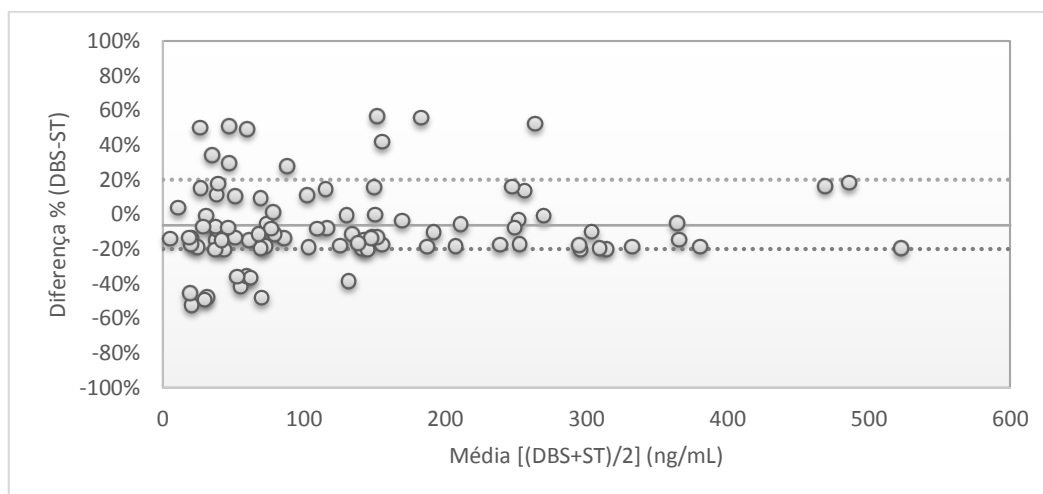
Os resultados obtidos para os limites de concordância, estabelecidos a partir do tratamento estatístico de Bland-Altman são significativamente superiores aos valores preferencialmente considerados como aceitáveis, tipicamente, valores inferiores ou iguais  $\pm 20\%$ . Tendo em conta este intervalo de aceitação, foram representados graficamente os resultados obtidos para a



**Figura 15** – Análise de Bland-Altman – Representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos a partir do método em sangue total (ST) e do método das DBS versus a média dos dois valores (onde, a linha contínua corresponde à diferença percentual média (-6,2%) e as linhas a tracejado representam os limites de concordância de 95% (-53% e 40%).

diferença percentual entre os dois métodos em função da média dos dois valores, à semelhança da anterior, desta vez utilizando um limite fixo pré-definido de  $\pm 20\%$  (ver **figura 16**). Calculada a percentagem de resultados positivos que cumpriram este critério, obteve-se um valor de 78%.

Este resultado permite comprovar que, mesmo utilizando limites de concordância mais exigentes e aceitáveis, uma elevada percentagem das amostras encontra-se dentro deste intervalo, o que se considera como um bom resultado de correlação entre as duas metodologias. Importa também referir, que dos resultados que se situam fora do intervalo estabelecido como adequado, a maioria observa-se para substâncias cuja concentração está presente em valores baixos para os quais, por um lado, um erro percentual superior ao aceitável é mais provável de se obter, e por outro, as diferenças obtidas não têm normalmente implicações na interpretação dos resultados analíticos. Para além deste facto, verifica-se igualmente que os piores resultados



**Figura 16** – Representação gráfica da diferença percentual entre os resultados obtidos a partir do método em sangue total (ST) e do método das DBS versus a média dos dois valores (onde, a linha contínua corresponde à diferença percentual média (-6,2%) e as linhas a tracejado representam os limites fixos de  $\pm 20\%$ )

em termos de concordância entre metodologias são mais predominantes no caso da morfina. Situação que poderá ter a sua justificação no facto de esta substância ser das que apresenta menores percentagens de recuperação das DBS (entre 51% e 61%), podendo traduzir alterações na eficiência da extração em função da amostra analisada tal como se verificou também em função do tempo de armazenamento para as amostras à temperatura ambiente, durante o estudo da estabilidade. Situações que não são corrigidas pelo padrão interno tendo em conta o procedimento adotado para a sua adição durante o procedimento de preparação das amostras. Também se verificam algumas situações de incumprimento para a cocaína. Nestes casos, para além de se tratarem na maior parte de concentrações baixas, também é importante não esquecer que esta substância sofre de rápida degradação quando armazenada em sangue total, pelo que o tempo que decorreu entre as análises realizadas utilizando cada uma das metodologias pode também explicar a diferença entre os valores obtidos.

## 5. CONCLUSÕES

As análises a partir da técnica de amostragem por *DBS* representam um método simples e de baixo custo para a determinação de diferentes analitos em amostras de sangue, em particular, na área da toxicologia forense para a análise de substâncias medicamentosas e/ou drogas de abuso. Apesar das vantagens importantes, que têm feito com que, ao longo das duas últimas décadas, tenham surgido cada vez mais aplicações baseadas na técnica de *DBS*, o número de trabalhos publicados relacionados com substâncias de interesse forense ainda é reduzido. A partir da investigação desenvolvida no presente trabalho é possível concluir que:

- a)* A amostragem por *DBS* permite a colheita de amostras com o mínimo de desconforto e por pessoal não médico reduzindo deste modo significativamente o tempo que pode decorrer entre a ocorrência dos factos e a colheita da amostra, permitindo estabelecer de forma mais rigorosa o estado de influência, quer em contexto da condução sob o efeito de drogas e/ou medicamentos (*DUID*), quer em situações de crimes facilitados por drogas ou até mesmo no seguimento clínico de toxicodependentes.
  
- b)* As *DBS* têm um efeito estabilizador sobre os analitos presentes na amostra devido à ausência de água, minimizando as reações enzimáticas e químicas de hidrólise, evitando deste modo, em grande parte, a degradação ou a formação de novos analitos. As *DBS* permitem muitas vezes o armazenamento a longo prazo das amostras à temperatura ambiente ou congeladas, protegidas da luz e humidade, e requerendo muito menor espaço para o efeito comparativamente com as amostras de sangue total.

- c) As *DBS* apresentam como grande benefício uma diminuição do risco de infeções no decurso do manuseamento das amostras contaminadas, nomeadamente com os vírus do VIH-SIDA e da hepatite C, uma vez que estes perdem a sua patogenicidade durante o processo da secagem das amostras devido a alterações na sua estrutura.
- d) As *DBS* devido às suas características permitem ser enviadas facilmente por correio normal sem a necessidade de requerer temperaturas e contentores especiais como acontece com as amostras de sangue total.
- e) O método desenvolvido na presente investigação reforça o potencial da análise por *DBS* de amostras forenses, revelando-se uma metodologia simples, económica e reprodutível baseada nesta técnica para a determinação e quantificação em simultâneo de um conjunto representativo das drogas de abuso de maior prevalência na área da toxicologia forense, nomeadamente, anfetaminas, opiáceos, cocaína, metadona e metabolitos, num total de 11 substâncias.
- f) O método desenvolvido para análise por *DBS* requer um volume pequeno de amostra (50  $\mu$ L), menos etapas na preparação comparativamente aos procedimentos convencionais por *SPE*, e elevada sensibilidade resultante da aplicação da tecnologia *UPLC-MS/MS*, que permite a análise das substâncias diretamente sem a necessidade de derivatização prévia como sucede, em geral, no caso da tecnologia de *GC-MS*.
- g) No que diz respeito ao efeito de matriz, não se registaram fenómenos significativos de supressão ou intensificação iónica para todas as substâncias com exceção da morfina e do EDDP, para as quais se observou a supressão moderada do sinal, situação que é corrigida pela presença dos respetivos padrões internos deuterados.



- h)* O método apresenta uma eficiência da extração elevada para a generalidade dos analitos com exceção da morfina e 6-monoacetilmorfina, que apresentaram recuperações inferiores, não passíveis de compensar com o padrão interno deuterado, tendo em conta a forma como o mesmo é adicionado às amostras durante o procedimento de preparação.
- i)* O estudo de estabilidade demonstrou que o armazenamento de todas as substâncias nas *DBS* é possível, pelo menos por um período de 8 meses, sem apresentar sinais de degradação significativos para as amostras armazenadas refrigeradas (2 – 8°C) e, em particular, para as congeladas a -10°C, incluindo substâncias instáveis como a cocaína que sofre degradação por hidrólise em amostras de sangue total quando armazenadas a 4°C ou a -20°C.
- j)* O método desenvolvido, tendo em conta o tipo de amostras analisado, revelou na generalidade dos casos uma boa correlação entre os resultados obtidos a partir das *DBS* e obtidos a partir de sangue total, estes através dos métodos empregues por rotina no SQTF.
- k)* Nos casos em que os critérios mínimos de precisão e exatidão não sejam cumpridos, para além de aplicações quantitativas, as *DBS* podem ser utilizadas para uma triagem rápida, uma vez que a utilização das *DBS* pode representar a simplificação da preparação da amostra e inclusive a sua automatização, e reduzir o volume de amostra necessário, fator muito importante em toxicologia forense, uma vez que nesta área o volume total de sangue disponível para a realização das análises pode ser limitado.

Apesar das vantagens associadas às *DBS* e da vasta gama de aplicações, esta técnica também enfrenta alguns desafios em geral, e em particular, na sua utilização para efeitos toxicológicos, principalmente na sua aplicação na colheita de amostras de sangue capilar, tanto no contexto do *DUID*, assim como nos crimes facilitados por drogas. Pelo que algumas considerações também devem ser feitas a esse respeito.

- l)* A realização de análises múltiplas, como seja, um rastreio primário seguido de posterior confirmação, pode ser difícil de repetir nos casos em que é utilizada a totalidade da mancha de sangue em cada extração, uma vez que o volume de sangue colhido nestes casos é muito reduzido.
- m)* A utilização da perfuração da *DBS* para a recolha de uma ou mais porções de apenas alguns milímetros da mancha de sangue seco, levanta outras questões, nomeadamente, a influência do local da perfuração e do volume de sangue manchado, o efeito cromatográfico e de hematócrito, temas relacionados com as *DBS* que têm sido amplamente discutidos e que envolvem a necessidade de uma validação mais extensa.
- n)* O número de aplicações realizadas num ambiente real e que demonstram a equivalência dos resultados obtidos a partir de diferentes fluidos biológicos, nomeadamente, entre sangue venoso e sangue capilar é bastante reduzido. Com base nos dados disponíveis, pode-se concluir que, na maioria dos casos, se consegue obter uma equivalência dos resultados obtidos a partir das *DBS* e das amostras de sangue total. Contudo, ainda não ficou estabelecido se o mesmo se pode dizer dos resultados obtidos a partir de manchas de sangue capilar *versus* sangue venoso, para a maior parte das substâncias.

## 6. PERSPETIVAS FUTURAS

Apesar de atualmente já existirem aplicações com resultados promissores para a análise de substâncias ilícitas a partir das *DBS* na área da toxicologia forense como referido e demonstrado no presente trabalho, são necessárias mais experiências para validar a utilização da técnica de amostragem por *DBS* em análises de rotina. Investimento que deve ser feito, uma vez que as vantagens apresentadas (nomeadamente, com a colheita rápida de uma amostra de sangue e a sua estabilização) sugerem que as *DBS* podem vir a desempenhar um papel importante no âmbito da fiscalização da condução sob o efeito de drogas. Adicionalmente, uma grande variedade de outras aplicações das *DBS* na área da toxicologia podem também representar uma mais-valia, nomeadamente, no contexto dos crimes facilitados por drogas (como já foi referido anteriormente), na toxicologia ocupacional ou na toxicologia clínica (ex: monitorização terapêutica).

No futuro imediato, pretende-se estender os estudos de estabilidade no armazenamento a períodos de tempo mais longos, para além de se alargar a técnica a outros grupos de substâncias, trabalho que já está em curso, mais concretamente, com a validação da metodologia para a análise de substâncias medicamentosas com elevado interesse forense, nomeadamente, um grupo representativo dos antidepressivos, antipsicóticos e ansiolíticos de maior prevalência.

Para que os métodos *DBS* possam fazer parte da rotina nos laboratórios de toxicologia, o futuro da investigação passa preferencialmente pela automatização do tratamento das amostras *DBS*, permitindo inclusive a ligação *online* de sistemas de eluição direta das *DBS* a equipamentos *LC-MS/MS* de elevada sensibilidade, possibilitando um maior rendimento no número de análises. No entanto, isso requer um investimento em equipamento dedicado, que pode não ser considerado viável por muitos laboratórios.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Rabie P, Denniff P, Spooner N, Brynjolfsson J, Galluzzo P, Sanders G. Method of applying internal standard to dried matrix spot samples for use in quantitative bioanalysis. *Anal. Chem.* 2011 Nov 15; 83(22): 8779-86.

Alfazil AA, Anderson RA. Stability of benzodiazepines and cocaine in blood spots stored on filter paper. *J Anal Tóxico* 2008 Set; 32(7): 511-5.

Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcão AC. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002 Jul 15; 774(2): 215-22.

Ambach L, Redondo AH, König S, Weinmann W. Rapid and simple LC-MS/MS screening of 64 novel psychoactive substances using dried blood spots. *Drug Test. Anal.* 2013 Abr; 6(4): 367-75.

Antelo-Domínguez A, Cocho JA, Tabernero MJ, Bermejo AM, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A. Simultaneous determination of cocaine and opiates in dried blood spots by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta* 2013 Dez; 117: 235-41.

Arora R, Hudson W, Boguszewski P. Effect of Hematocrit on analyte quantification using dried blood spot technology for pharmaceutical bioanalysis. Agilent Technologies. [www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-9630EN.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-9630EN.pdf)

Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6ª Edição. Foster City: Biomedical Publications; 2002.

Bosker WM, Huestis MA. Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin. Chem.* 2009 Nov; 55(11):1910–31.

Clavijo CF, Hoffman KL, Thomas JJ, Carvalho B, Chu LF, Driver DR, Hammer GB, Christians U, Galinkin JL. A sensitive assay for the quantification of morphine and its active metabolites in human plasma and dried blood spots using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011 Mai; 400(3):715-28.

Cobb Z, de Vries R, Spooner N, Williams S, Staelens L, Doig M, Broadhurst R, Barfield M, van de Merbel N, Schmid B, Siethoff C, Ortiz J, Verheij E, van Baar B, White S, Timmerman P. In-depth study of homogeneity in DBS using two different techniques: results from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis* 2013 Set; 5(17): 2161-9.

Cvan Trobeck K, Trontelj J, Springer J, Lainscak M, Kerec Kos M. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of bisoprolol, ramiprilat, propranolol and midazolam in rat dried blood spots. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life sci.* 2014 Mai 1; 958: 29-35.

De Vries R, Barfield M, van de Merbel N, Schmid B, Siethoff C, Ortiz J, Verheij E, van Baar B, Cobb Z, White S, Timmerman P. The effect of hematocrit on bioanalysis of DBS: results from the EBF DBS-sampling consortium. *Bioanalysis* 2013 Set; 5(17): 2147-60.

Déglon J, Thomas A, Daali Y, Lauer E, Samer C, Desmeules J, Dayer P, Mangin P, Staub C. Automated system for on-line desorption of dried blood spots applied to LC/MS/MS pharmacokinetic study of flubiprofen and its metabolite. *J. Pharmac. Biomed. Anal.* 2011 Jan; 54(2): 359-67.

Déglon J, Thomas A, Mangin P, Staub C. Direct analysis of dried blood spots coupled with mass spectrometry: concepts and biomedical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012 Mar; 402(8): 2485-98.

Déglon J, Versace F, Lauer E, Widmer C, Mangin P, Thomas A, Staub C. Rapid LC–MS/MS quantification of the major benzodiazepines and their metabolites on dried blood spots using a simple and cost- effective sample pretreatment. *Bioanalysis* 2012 Jun; 4(11): 1337–50.

De Kesel PM, Sadones N, Capiou S, Lambert WE, Stove CP. Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: challenges and solutions. *Bioanalysis* 2013 Ago; 5(16): 2023-41.

Déglon J, Thomas A, Cataldo A, Mangin P, Staub C. On-line desorption of dried blood spot: a novel approach for the direct LC/MS analysis of micro-whole blood samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009 Mai 1; 49(4), 1034-9.

Déglon J, Versace F, Lauer E, Widmer C, Mangin P, Thomas A, Staub C. Rapid LC–MS/MS quantification of the major benzodiazepines and their metabolites on dried blood spots using a simple and cost-effective sample pretreatment. *Bioanalysis* 2012 Jun; 4(11): 1337-50.

De La Torre R, Farré M, Navarro M, Pacifici R, Zuccaro P, Pichini S. Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances: monitoring in conventional and non-conventional matrices. *Clin. Pharmacokinet.* 2004; 43(3): 157-85.

Demirev PA. Dried blood spots: analysis and applications. *Anal. Chem.* 2013; 85(2): 779-89.

Denniff P, Spooner N. The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs. *Bioanalysis* 2010 Ago; 2(8): 1385-95.

Dewitte K, Fierens C, Stockl D, Thienpont L. Application of the Bland-Altman plot for interpretation of method- comparison studies: a critical investigation of its practice. *Clin. Chem.* 2002 Mai; 48(5), 799–801.

Drummer OH. Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Sci. Int.* 2004 Jun 10; 142(2-3): 101–13.

Eap CB, Buclin T, Bauman P. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone. *Clin. Pharmacokinet.* 2002; 41(14): 1153-93.

Edelbroek PM, van der Heijden J, Stolk LM. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls. *Ther. Drug Monit.* 2009 Jun; 31(3): 327-36.

Garcia Boy R, Henseler R, Mattern R, Skopp G. Determination of morphine and 6-acetylmorphine in blood with use of dried blood spots. *Ther. Drug Monit.* 2008 Dez; 30(6): 733-9.

Garrido MJ, Trocóniz IF. Methadone: a review of its pharmacokinetic/pharmacodynamic properties. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 1999 Out; 42(2): 61-6.

Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963 Set; 32: 338-43.

Harris DS, Everhart ET, Mendelson J, Jones RT. The pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration. *Drug Alcohol Depend.* 2003 Nov 24; 72(2): 169-82.

Henderson LO, Powell MK, Hannon WH, Bernert JT Jr, Pass KA, Fernhoff P, Ferre CD, Martin L, Franko E, RoCHAT RW, Brantley MD, Sampson E. An evaluation of the use of dried blood spots from newborn screening for monitoring the prevalence of cocaine use among childbearing women. *Biochem Mol Med* 1997 Ago; 61(2): 143–151.

Henderson LO, Powell MK, Hannon WH, Miller BB, Martin ML, Hanzlick RL, Vroon D, Sexson WR. Radioimmunoassay screening of dried blood spot materials for benzoylecgonine. *J Anal Toxicol* 1993 Jan/Fev; 17: 42–47.

Hernández Redondo A, Schroeck A, Kneubuehl B, Weinmann W. Determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate from dried blood spots. *Int. J. Legal Med.* 2013 Jul; 127(4): 769-75.

Hudson W, Yong B, Boguszewski P. Analysis of clozapine, nortriptyline, paroxetine and zolpidem using dried blood spots. Agilent Technologies. <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-8033EN.pdf>

Huestis MA, Verstraete A, Kwong TC, Morland J, Vincent MJ, de la Torre R. Oral fluid testing: promises and pitfalls. *Clin. Chem.* 2011 Jun; 57(6): 805–10.

Ingels AS, De Paepe P, Anseeuw K, Van Sassenbroeck D, Neels H, Lambert W, Stove C. Dried blood spot punches for confirmation of suspected  $\gamma$ -hydroxybutyric acid intoxications: validation of an optimized GC-MS procedure. *Bioanalysis* 2011 Out; 3(20): 2271-81.

Ingels AS, Lambert W, Stove C. Determination of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in dried blood spots using a simple GC-MS method with direct “on spot” derivatization. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010 Nov; 398 (5): 2173-82.



Isenschmid DS. Cocaine – Effects on human performance and behavior. *Forensic Sci. Rev.* 2002 Feb; 14(1-2): 61-100.

Jantos R, Veldstra JL, Mattern R, Brookhuis KA, Skopp G. Analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine: whole blood versus dried blood spots. *J. Anal. Toxicol.* 2011 Jun; 35(5): 269-73.

Jantos R, Skopp G. Comparison of drug analysis in whole blood and dried blood spots. *Toxichem. Krimtech.* 2011; 78: 268–75.

Kalant H. The pharmacology and toxicology of “ecstasy” (MDMA) and related drugs. *CMAJ.* 2001 Out 2; 165(7): 917-28.

Keevil BG. The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 2011 Jan; 44(1): 110-8.

Kolbrich EA, Goodwin RS, Gorelick DA, Hayes RJ, Stein EA, Huestis MA. Physiological and subjective responses to controlled oral 3,4-methylenedioxy methamphetamine administration. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2008 Ago; 28(4): 432-40.

La Marca G, Malvagia S, Filippi L, Fiorini P, Innocenti M, Luceri F, Pieraccini G, Moneti G, Francese S, Dani FR, Guerrini R. Rapid assay of topiramate in dried blood spots by a new liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. *J Pharmac Biomed Anal* 2008 Dez 15; 48(5): 1392-6.

Langel K, Uusivirta H, Ariniemi K, Lillsunde P. Analysis of drugs of abuse by GC-MS in dried blood spot sample matrix. Apresentado no: 49<sup>th</sup> Annual Meeting of The International

Association of Forensic Toxicologists (TIAFT). San Francisco, CA, USA, 25-30 September 2011.

Lauer E, Déglon J, Versace F, Thomas A, Mangin P, Staub C. Target screening of drugs from dried blood spot samples based on LC-MS/MS and on-line desorption. Apresentado no: 49<sup>th</sup> Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT). San Francisco, CA, USA, 25-30 September 2011.

Lawson G, Cocks EM, Tanna S. Quantitative determination of atenolol in dried blood spot samples by LC-HRMS: a potential method for assessing medication adherence. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012 Mai 15; 897: 72-79.

Li F, Zulkoski J, Fast D, Michael S. Perforated dried blood spots: a novel format for accurate microsampling. *Bioanalysis* 2011 Out; 3(20): 2321-33.

Li F, Ploch S, Fast D, Michael S. Perforated dried blood spot accurate microsampling: the concept and its applications in toxicokinetic sample collection. *J. Mass Spectrom.* 2012 Mai; 47(5): 655-67.

Li W, Tse FLS. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed. Chromatogr.* 2010 Jan; 24(1): 49-65.

Li Y, Kantelip JP, Gerritsen-van Schieveen P, Davani S. Interindividual variability of methadone response: impact of genetic polymorphism. *Mol. Diagn. Ther.* 2008; 12(2): 109-24.

Manicke NE, Abu-Rabie P, Spooner N, Ouyang Z, Cooks RG. Quantitative analysis of therapeutic drugs in dried blood spot samples by paper spray mass spectrometry: an avenue to therapeutic drug monitoring. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2011 Set; 22(9): 1501-7.

Matsumoto T, Kamijo A, Miyakawa T, Endo K, Yabana T, Kishimoto H, Okudaira K, Iseki E, Sakai T, Kosaka K. Methamphetamine in Japan: the consequences of methamphetamine abuse as a function of route of administration. *Addiction* 2002 Jul; 97(7): 809-17.

McCance-Katz EF, Price LH, McDougale CJ, Kosten TR, Black JE, Jatlow PI. Concurrent cocaine-ethanol ingestion in humans: pharmacology, physiology, behavior, and the role of cocaethylene. *Psychopharmacology* 1993; 111(1): 39-46.

McDade TW. Development and validation of assay protocols for use with dried blood spot samples. *Am. J. Hum. Biol.* 2014 Jan-Feb; 26(1): 1-9.

Meesters RJW, Hoof GP. State-of-the-art dried blood spot analysis: an overview of recent advances and future trends. *Bioanalysis* 2013 Set; 5(17): 2187-208.

Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J. Nutr.* 2001 Mai; 131(5): 1631S-1636S.

Mercolini L, Mandrioli R, Gerra G, Raggi MA. Analysis of cocaine and two metabolites in dried blood spots by liquid chromatography with fluorescence detection: A novel test for cocaine and alcohol intake. *J. Chromatogr. A* 2010 Nov; 1217(46): 7242-8.

Mommers J, Mengerink Y, Ritzen E, Weusten J, van der Heijden J, van der Wal S. Quantitative analysis of morphine in dried blood spots by using morphine-d3 pre-impregnated dried blood spot cards. *Anal Chim Acta* 2013 Abr 24; 774: 26-32.

O'Broin S. Influence of hematocrit on quantitative analysis of "blood spots" on filter paper. *Clin. Chem.* 1993 Jun; 39(6): 1354-5.

O'Mara M, Hudson-Curtis B, Olson K, Yueh Y, Dunn J, Spooner N. The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples. *Bioanalysis* 2011 Out; 3(20): 2335-47.

Otero-Fernández M, Cocho JA, Tabernero MJ, Bermejo AM, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A. Direct tandem mass spectrometry for the simultaneous assay of opioids, cocaine and metabolites in dried urine spots. *Anal. Chim. Acta*. 2013 Jun 19; 784: 25-32.

Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int*. 2007 Jan; 165 (2-3): 216-24.

Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review [review]. *Accred. Qual. Assur*. 2002; 7: 441-9.

Pizarro N, Llebaria A, Cano S, Joglar J, Farré M, Segura J, De La Torre R. Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2003; 17(4): 330-6.

Popov TV, Maričić LC, Prosen H, Vončina DB. Development and validation of dried blood spots technique for quantitative determination of topiramate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr*. 2013 Ago; 27(8): 1054-61.

Quraishi R, Jain R, Ambekar A. The use of dried blood spot samples in screening drugs of abuse. *Pharmacol. & Pharm*. 2013 Abr; 4: 152-9.

Rao RN, Raju SS, Vali RM, Sankar GG. Liquid chromatography-mass spectrometry determination of Losartan and its active metabolite on dried blood spots. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. 2012 Ago; 902: 47-54.

Sadones N, Capiou S, De Kesel P, Lambert WE, Stove C. Spot them in the spot: analysis of abused substances using dried blood spots. *Bioanalysis* 2014 Ago; 6(17): 2211-27.

Saracino MA, Marcheselli C, Somaini L, Pieri MC, Gerra G, Ferranti A, Raggi MA. A novel test using dried blood spots for the chromatographic assay of methadone. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012 Ago; 404(2): 503-11.

Saussereau E, Lacroix C, Gaulier JM, Goulle JP. On-line liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 Feb 15; 885-886: 1-7.

Sharma A, Jaiswal S, Shukla M, Lal J. Dried blood spots: concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug Test Anal.* 2014 Mai; 6(5): 399-414.

Sosnoff CS, Ann Q, Bernert JT Jr, Powell MK, Miller BB, Henderson LO, Hannon WH, Fernhoff P, Sampson EJ. Analysis of benzoylecgonine in dried blood spots by liquid chromatography– atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 1996 Mai-Jun; 20(3): 179–84.

Spooner N, Lad R, Barfield M. Dried blood spots as a sample collection technique for the determination of pharmacokinetics in clinical studies: considerations for the validation of a quantitative bioanalytical method. *Analytical Chemistry* 2009 Feb 15; 81(4): 1557-1563.

Stockl D, Dewitte K, Thienpont L. Validity of linear regression in method comparison studies: is it limited by the statistical model or the quality of the analytical input data? *Clin. Chem.* 1998 Nov; 44(11): 2340–6.

Stout PR, Farrell LJ. Opioids – Effects on human performance and behavior. *Forensic Sci. Rev.* 2003 Jan; 15(1): 29-59.

Stove CP, Ingels AS, De Kesel PM, Lambert WE. Dried blood spots in toxicology: from the cradle to the grave? *Crit. Rev. Toxicol.* 2012 Mar; 42(3): 230-43.

SWGTOX – Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology SWGTOX Doc 003. Online website <http://www.swgtox.org/documents/validation3.pdf>.

Thomas A, Deglon J, Steimer T, Mangin P, Daali Y, Staub C. On-line desorption of dried blood spots coupled to hydrophilic interaction/reversed-phase LC/MS/MS system for the simultaneous analysis of drugs and their polar metabolites. *J. Sep. Sci.* 2010 Mar; 33(6-7): 873-9.

Thomas A, Geyer H, Schänzer W, Crone C, Kellmann M, Moehring T, Thevis M. Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012 Mai; 403(5): 1279-89.

Timmerman P, White S, Cobb Z, de Vries R, Thomas E, van Baar B, European Bioanalysis Forum. Update of the EBF recommendation for the use of DBS in regulated bioanalysis integrating the conclusions from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis* 2013 Set; 5(17): 2129-36.

Timmerman P, White S, Globig S, Lüdtke S, Brunet L, Smith C, Smeraglia J. EBF and dried blood spots: from recommendations to potential resolution. *Bioanalysis* 2011 Ago; 3(16): 1787-9.

Timmerman P, White S, Globig S, Lüdtke S, Bruner L, Smeraglia J. EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. *Bioanalysis* 2011 Jul; 3(14): 1567-75.

Van der Heijden J, de Beer Y, Hoogtanders K, Christiaans M, de Jong GJ, Neef C, Stolk L. Therapeutic drug monitoring of everolimus using the dried blood spot method in combination with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009 Nov 1; 50(4): 664-70.

Van Baar BLM, Verhaeghe T, Heudi O, Rohde M, Wood S, Wieling J, de Vries R, White S, Cobb Z, Timmerman P. IS addition In bioanalysis of DBS: results from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis* 2013 Set; 5(17): 2137-45.

Versace F, Déglon J, Lauer E, Mangin P, Staub C. Automated DBS extraction prior to HILIC/RP LC–MS/MS target screening of drugs. *Chromatographia* 2013 Out; 76(19–20): 1281–93.

Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Franceschi D, Sedler M, Gatley SJ, Miller E, Hitzemann R, Ding YS, Logan J. Loss of dopamine transporters in methamphetamine abusers recovers with protracted abstinence. *J. Neurosci.* 2001 Dez 1; 21(23): 9414-8.

Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Leonido-Yee M, Franceschi D, Sedler MJ, Gatley SJ, Hitzemann R, Ding YS, Logan J, Wong C, Miller EN. Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. *Am. J. Psychiatry.* 2001 Mar; 158(3): 377-82.

Youhnovski N, Bergeron A, Furtado M, Garofolo F. Pre-cut dried blood spot (PCDBS): an alternative to dried blood spot (DBS) technique to overcome hematocrit impact. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011 Oct 15; 25(19): 2951-8.

WADA – World Anti-Doping Agency. International Standard for Laboratories. Identification criteria for qualitative assays TD2010IDCR. Online website <http://www.wada-ama.org/en/Anti-Doping-Community/Anti-Doping-Laboratories/Technical-Documents/>.

Waterman KC, Adami RC. Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 2005 Apr 11; 293: 101–25.

Zimmer D, Hassler S, Betschart B, Sack S, Fankhauser C, Loppacher M. Internal standard application to dried blood spots by spraying: investigation of the internal standard distribution. 2013 Mar; 5(6): 711-9.

Zörntlein SW, Kopp A, Becker J, Kaufmann TJ, Rohrich J, Urban R. In vitro production of GHB in blood and serum samples under various storage conditions. *Forensic Sci. Int.* 2012 Jan 10; 214 (1-3): 113-7.



## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO A – RESULTADOS OBTIDOS NO ESTUDO DO LD E LQ PARA CADA UMA DAS SUBSTÂNCIAS

*Tabela A1 – Estudo do LD e LQ para a morfina.*

#### *Limite de detecção*

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	S/R PB	S/R ID
CQ (Cal 1 ng/mL)	0,83	0,83	1,000		29	23	79%	69% - 89%	38	9
Replic._1	0,83	0,83	1,000	0,00%	45	36	80%		31	18
Replic._2	0,83	0,83	1,000	0,00%	41	28	70%		21	16
Replic._3	0,83	0,83	1,000	0,00%	38	33	87%		17	8
Replic._4	0,83	0,83	1,000	0,00%	36	30	84%		189	4
Replic._5	0,83	0,83	1,000	0,00%	38	30	80%		35	13

#### *Limite de quantificação*

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	Conc. (ng/mL)
CQ (Cal 5 ng/mL)	0,84	0,83	1,012		218	162	74%	64% - 84%	
Replic._1	0,84	0,83	1,012	0,00%	226	176	78%		5,15
Replic._2	0,84	0,83	1,012	0,00%	214	154	72%		4,77
Replic._3	0,84	0,83	1,012	0,00%	230	167	73%		4,54
Replic._4	0,84	0,83	1,012	0,00%	228	169	74%		4,87
Replic._5	0,84	0,83	1,012	0,00%	235	189	80%		5,20

**Méd. (ng/mL)** **4,91**  
**Desv. Pad. (s)** **0,27**  
**CV (%)** **5,6**  
**Erro (%)** **1,9**

Tabela A2 – Estudo do LD e LQ para a codeína.

## Limite de detecção

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	S/R PB	S/R ID
CQ (Cal 1 ng/mL)	1,23	1,23	1,000		245	107	44%	35% - 53%	1099	2022
Replic._1	1,23	1,23	1,000	0,00%	236	123	52%		1024	622
Replic._2	1,24	1,23	1,008	0,81%	251	108	43%		1207	62
Replic._3	1,23	1,23	1,000	0,00%	263	137	52%		1173	371
Replic._4	1,24	1,23	1,008	0,81%	257	136	53%		402	3614
Replic._5	1,23	1,23	1,000	0,00%	275	144	52%		346	346

## Limite de quantificação

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	Conc. (ng/mL)
CQ (Cal 2 ng/mL)	1,23	1,23	1,000		492	248	50%	40% - 60%	
Replic._1	1,24	1,23	1,008	0,81%	481	257	53%		1,91
Replic._2	1,23	1,23	1,000	0,00%	433	200	46%		1,91
Replic._3	1,23	1,23	1,000	0,00%	452	269	59%		1,85
Replic._4	1,24	1,23	1,008	0,81%	394	199	50%		1,97
Replic._5	1,23	1,23	1,000	0,00%	428	247	58%		1,73
Méd. (ng/mL)									1,87
Desv. Pad. (s)									0,091
CV (%)									4,9
Erro (%)									6,3

Tabela A3 – Estudo do LD e LQ para a 6-monoacetilmorfina.

## Limite de detecção e de quantificação

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	S/R PB	S/R ID
CQ (Cal 5 ng/mL)	1,38	1,38	1,000		340	264	78%	68% - 88%	485	1048
Replic._1	1,39	1,38	1,007	0,72%	374	323	86%		167	46
Replic._2	1,38	1,38	1,000	0,00%	335	291	87%		1602	25
Replic._3	1,39	1,38	1,007	0,72%	350	305	87%		1035	153
Replic._4	1,39	1,38	1,007	0,72%	323	256	79%		42	113
Replic._5	1,38	1,38	1,000	0,00%	404	338	84%		300	74
									Conc. (ng/mL)	
									4,63	
									4,96	
									5,36	
									4,64	
									5,67	
Méd. (ng/mL)									5,05	
Desv. Pad. (s)									0,46	
CV (%)									9,0	
Erro (%)									1,0	

Tabela A4 – Estudo do LD e LQ para a anfetamina.

**Limite de detecção**

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	S/R PB	S/R ID
CQ (Cal 1 ng/mL)	1,41	1,40	1,007		906	534	59%	49% - 69%	17	209
Replic._1	1,41	1,40	1,007	0,00%	1188	594	50%		25	337
Replic._2	1,41	1,40	1,007	0,00%	1317	783	59%		46	1014
Replic._3	1,41	1,40	1,007	0,00%	1367	847	62%		89	2241
Replic._4	1,41	1,40	1,007	0,00%	1232	649	53%		14	481
Replic._5	1,41	1,40	1,007	0,00%	1121	664	59%		22	45

**Limite de quantificação**

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	Conc. (ng/mL)
CQ (Cal 2 ng/mL)	1,41	1,40	1,007		2176	1349	62%	52% - 72%	
Replic._1	1,41	1,41	1,000	0,71%	2345	1421	61%		1,77
Replic._2	1,41	1,41	1,000	0,71%	2181	1562	72%		2,01
Replic._3	1,41	1,41	1,000	0,71%	2340	1546	66%		2,08
Replic._4	1,41	1,40	1,007	0,00%	2406	1393	58%		1,84
Replic._5	1,41	1,40	1,007	0,00%	1829	1303	71%		1,52
Méd. (ng/mL)									1,84
Desv. Pad. (s)									0,22
CV (%)									12
Erro (%)									7,8

Tabela A5 – Estudo do LD e LQ para o MDA.

**Limite de detecção e de quantificação**

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	S/R PB	S/R ID
CQ (Cal 2 ng/mL)	1,45	1,54	0,942		4957	1420	29%	23% - 35%	41	2503
Replic._1	1,45	1,53	0,948	0,65%	5101	1606	31%		71	2934
Replic._2	1,45	1,53	0,948	0,65%	4869	1495	31%		36	3224
Replic._3	1,45	1,53	0,948	0,65%	5477	1674	31%		37	3760
Replic._4	1,45	1,53	0,948	0,65%	6227	1852	30%		34	1471
Replic._5	1,45	1,53	0,948	0,65%	5261	1383	26%		29	136
									Conc. (ng/mL)	
									2,04	
									1,85	
									2,47	
									2,26	
									1,81	
Méd. (ng/mL)									2,09	
Desv. Pad. (s)									0,28	
CV (%)									13	
Erro (%)									4,3	

Tabela A6 – Estudo do LD e LQ para a metanfetamina.

## Limite de detecção

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	S/R PB	S/R ID
CQ (Cal 0,5 ng/mL)	1,51	1,50	1,007		1418	531	37%	30% - 44%	187	21
Replic._1	1,51	1,51	1,000	0,66%	1925	672	35%		144	368
Replic._2	1,51	1,51	1,000	0,66%	2182	816	37%		583	2138
Replic._3	1,51	1,50	1,007	0,00%	1115	339	30%		102	56
Replic._4	1,51	1,51	1,000	0,66%	1695	509	30%		152	639
Replic._5	1,51	1,51	1,000	0,66%	1770	659	37%		304	194

## Limite de quantificação

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	Conc. (ng/mL)
CQ (Cal 2 ng/mL)	1,51	1,50	1,007		6290	2337	37%	30% - 44%	
Replic._1	1,51	1,51	1,000	0,66%	7367	3055	41%		1,80
Replic._2	1,51	1,51	1,000	0,66%	5959	2375	40%		1,88
Replic._3	1,51	1,50	1,007	0,00%	6538	2636	40%		1,66
Replic._4	1,51	1,51	1,000	0,66%	6086	2647	43%		1,65
Replic._5	1,51	1,51	1,000	0,66%	5920	2312	39%		1,76

Méd. (ng/mL) 1,75  
Desv. Pad. (s) 0,097  
CV (%) 5,5  
Erro (%) 12

Tabela A7 – Estudo do LD e LQ para o MDMA.

## Limite de detecção

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	S/R PB	S/R ID
CQ (Cal 0,5 ng/mL)	1,53	1,53	1,000		1423	600	42%	34% - 50%	8085	379
Replic._1	1,54	1,53	1,007	0,65%	1524	727	48%		104	202
Replic._2	1,54	1,54	1,000	0,00%	1671	786	47%		208	96
Replic._3	1,54	1,53	1,007	0,65%	1382	576	42%		119	29
Replic._4	1,53	1,53	1,000	0,00%	1366	469	34%		355	344
Replic._5	1,54	1,53	1,007	0,65%	1276	633	50%		2805	238

## Limite de quantificação

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	Conc. (ng/mL)
CQ (Cal 1 ng/mL)	1,54	1,53	1,007		2780	1091	39%	31% - 47%	
Replic._1	1,54	1,53	1,007	0,00%	2815	1121	40%		0,90
Replic._2	1,54	1,53	1,007	0,00%	3324	1484	45%		1,01
Replic._3	1,54	1,53	1,007	0,00%	2940	1070	36%		0,88
Replic._4	1,54	1,54	1,000	0,65%	3224	1242	39%		0,97
Replic._5	1,54	1,54	1,000	0,65%	2952	1360	46%		0,86

Méd. (ng/mL) 0,92  
Desv. Pad. (s) 0,063  
CV (%) 6,9  
Erro (%) 7,6

Tabela A8 – Estudo do LD e LQ para a benzoilecgonina.

**Limite de detecção**

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	S/R PB	S/R ID
CQ (Cal 0,5 ng/mL)	1,61	1,61	1,000		2184	769	35%	28% - 42%	342	342
Replic._1	1,61	1,61	1,000	0,00%	2078	867	42%		130	1320
Replic._2	1,61	1,61	1,000	0,00%	1916	682	36%		174	225
Replic._3	1,61	1,61	1,000	0,00%	2047	803	39%		164	104
Replic._4	1,61	1,61	1,000	0,00%	1512	563	37%		144	163
Replic._5	1,61	1,61	1,000	0,00%	2155	881	41%		259	122

**Limite de quantificação**

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	Conc. (ng/mL)
CQ (Cal 1 ng/mL)	1,61	1,61	1,000		4220	1829	43%	34% - 52%	
Replic._1	1,61	1,61	1,000	0,00%	3183	1079	34%		0,93
Replic._2	1,61	1,61	1,000	0,00%	3971	1536	39%		0,87
Replic._3	1,61	1,61	1,000	0,00%	4168	1654	40%		0,89
Replic._4	1,61	1,61	1,000	0,00%	3810	1572	41%		0,88
Replic._5	1,61	1,61	1,000	0,00%	4254	1444	34%		0,78

Méd. (ng/mL) **0,87**  
 Desv. Pad. (s) **0,055**  
 CV (%) **6,3**  
 Erro (%) **13**

Tabela A9 – Estudo do LD e LQ para a cocaína.

**Limite de detecção**

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	S/R PB	S/R ID
CQ (Cal 0,5 ng/mL)	2,05	2,05	1,000		2708	676	25%	20% - 30%	287	168
Replic._1	2,05	2,05	1,000	0,00%	2225	552	25%		281	190
Replic._2	2,05	2,05	1,000	0,00%	2381	558	23%		334	850
Replic._3	2,05	2,05	1,000	0,00%	2081	542	26%		401	158
Replic._4	2,05	2,05	1,000	0,00%	2574	561	22%		398	131
Replic._5	2,05	2,05	1,000	0,00%	2397	599	26%		97	129

**Limite de quantificação**

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	Conc. (ng/mL)
CQ (Cal 1 ng/mL)	2,05	2,05	1,000		4834	1238	26%	21% - 31%	
Replic._1	2,05	2,05	1,000	0,00%	4385	1018	23%		0,81
Replic._2	2,05	2,05	1,000	0,00%	4936	1137	23%		0,91
Replic._3	2,05	2,05	1,000	0,00%	4815	1094	23%		1,02
Replic._4	2,05	2,05	1,000	0,00%	4351	1084	25%		0,81
Replic._5	2,05	2,05	1,000	0,00%	4575	1057	23%		0,87

Méd. (ng/mL) **0,88**  
 Desv. Pad. (s) **0,087**  
 CV (%) **9,8**  
 Erro (%) **12**

Tabela A10 – Estudo do LD e LQ para o EDDP.

**Limite de detecção**

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	S/R PB	S/R ID
CQ (Cal 0,5 ng/mL)	2,80	2,80	1,000		679	279	41%	33% - 49%	39	1357
Replic._1	2,80	2,80	1,000	0,00%	636	314	49%		119	164
Replic._2	2,80	2,80	1,000	0,00%	686	301	44%		31	70
Replic._3	2,80	2,80	1,000	0,00%	401	196	49%		40	73
Replic._4	2,80	2,80	1,000	0,00%	674	294	44%		75	83
Replic._5	2,80	2,80	1,000	0,00%	925	454	49%		73	161

**Limite de quantificação**

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	Conc. (ng/mL)
CQ (Cal 5 ng/mL)	2,80	2,80	1,000		4576	1979	43%	34% - 52%	
Replic._1	2,80	2,80	1,000	0,00%	3243	1529	47%		5,00
Replic._2	2,81	2,80	1,004	0,36%	3394	1416	42%		4,58
Replic._3	2,80	2,80	1,000	0,00%	3786	1695	45%		5,02
Replic._4	2,80	2,80	1,000	0,00%	3995	1863	47%		4,65
Replic._5	2,80	2,80	1,000	0,00%	3589	1558	43%		5,83
Méd. (ng/mL)									5,02
Desv. Pad. (s)									0,50
CV (%)									9,9
Erro (%)									0,3

Tabela A11 – Estudo do LD e LQ para a metadona.

**Limite de detecção**

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	S/R PB	S/R ID
CQ (Cal 0,5 ng/mL)	3,01	3,01	1,000		2676	1966	73%	63% - 83%	104	463
Replic._1	3,02	3,01	1,003	0,33%	3375	2672	79%		227	528
Replic._2	3,01	3,01	1,000	0,00%	3409	2439	72%		253	81
Replic._3	3,01	3,01	1,000	0,00%	2841	1781	63%		109	125
Replic._4	3,01	3,01	1,000	0,00%	3597	2389	66%		763	7669
Replic._5	3,02	3,01	1,003	0,33%	3695	2376	64%		135	2789

**Limite de quantificação**

Amostra	RT	IS RT	TRR	DTRR	Área PB	Área ID	AID/APB	Int.Tol.	Conc. (ng/mL)
CQ (Cal 2 ng/mL)	3,01	3,01	1,000		15779	9193	58%	48% - 68%	
Replic._1	3,02	3,01	1,003	0,33%	13870	8037	58%		1,82
Replic._2	3,02	3,01	1,003	0,33%	11571	7701	67%		1,88
Replic._3	3,02	3,01	1,003	0,33%	11709	7930	68%		1,82
Replic._4	3,02	3,01	1,003	0,33%	13471	8483	63%		1,90
Replic._5	3,02	3,01	1,003	0,33%	13288	8618	65%		1,79
Méd. (ng/mL)									1,84
Desv. Pad. (s)									0,046
CV (%)									2,5
Erro (%)									7,9

## 8.2. ANEXO B – RESULTADOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DA LINEARIDADE E SELEÇÃO DO MODELO DE CALIBRAÇÃO

*Tabela B1 – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a morfina.*

Ponderação ( $w_i$ )	ER% ( $r^2$ )					$\Sigma ER\%$	$r^2$ (média)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>1</b>	221 (0,9998)	1032 (0,9958)	244 (0,9996)	910 (0,9965)	332 (0,9991)	2739	0,9982
<b><math>1/\sqrt{x}</math></b>	63 (0,9997)	268 (0,9942)	54 (0,9995)	212 (0,9954)	79 (0,9990)	676	0,9976
<b><math>1/x</math></b>	28 (0,9996)	90 (0,9922)	49 (0,9991)	62 (0,9942)	36 (0,9987)	264	0,9968
<b><math>1/x^2</math></b>	28 (0,9983)	76 (0,9883)	45 (0,9929)	44 (0,9950)	36 (0,9955)	230	0,9940
<b><math>1/\sqrt{y}</math></b>	65 (0,9997)	282 (0,9939)	56 (0,9994)	222 (0,9952)	81 (0,9990)	706	0,9975
<b><math>1/y</math></b>	28 (0,9996)	94 (0,9918)	47 (0,9991)	62 (0,9940)	36 (0,9987)	267	0,9966
<b><math>1/y^2</math></b>	29 (0,9983)	76 (0,9883)	46 (0,9940)	46 (0,9951)	37 (0,9960)	234	0,9944

*Tabela B2 – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a codeína.*

Ponderação ( $w_i$ )	ER% ( $r^2$ )					$\Sigma ER\%$	$r^2$ (média)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>1</b>	553 (0,9982)	128 (0,9999)	273 (0,9984)	172 (0,9999)	58 (0,9999)	1184	0,9993
<b><math>1/\sqrt{x}</math></b>	152 (0,9979)	82 (0,9998)	57 (0,9982)	110 (0,9998)	64 (0,9999)	466	0,9991
<b><math>1/x</math></b>	63 (0,9973)	74 (0,9994)	62 (0,9977)	90 (0,9992)	62 (0,9996)	352	0,9986
<b><math>1/x^2</math></b>	42 (0,9959)	65 (0,9860)	53 (0,9934)	73 (0,9864)	62 (0,9889)	295	0,9901
<b><math>1/\sqrt{y}</math></b>	155 (0,9980)	82 (0,9998)	57 (0,9981)	114 (0,9998)	63 (0,9999)	472	0,9991
<b><math>1/y</math></b>	65 (0,9974)	74 (0,9994)	63 (0,9976)	91 (0,9993)	62 (0,9997)	354	0,9987
<b><math>1/y^2</math></b>	93 (0,9959)	64 (0,9906)	55 (0,9938)	73 (0,9905)	59 (0,9929)	344	0,9927

Onde ER% é o erro relativo percentual correspondente a todos os calibradores da curva para um determinado  $w_i$ .

**Tabela B3** – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a 6-monoacetilmorfina.

Ponderação ( $w_i$ )	ER% ( $r^2$ )					$\Sigma ER\%$	$r^2$ (média)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>1</b>	228 (0,9933)	102 (0,9981)	67 (0,9990)	23 (0,9997)	136 (0,9979)	556	0,9976
<b><math>1/\sqrt{x}</math></b>	80 (0,9923)	47 (0,9978)	59 (0,9984)	13 (0,9996)	50 (0,9976)	249	0,9972
<b><math>1/x</math></b>	38 (0,9914)	50 (0,9971)	56 (0,9970)	14 (0,9996)	35 (0,9972)	193	0,9965
<b><math>1/x^2</math></b>	36 (0,9927)	48 (0,9902)	54 (0,9878)	11 (0,9993)	30 (0,9962)	180	0,9932
<b><math>1/\sqrt{y}</math></b>	77 (0,9918)	47 (0,9979)	58 (0,9985)	13 (0,9996)	52 (0,9975)	248	0,9971
<b><math>1/y</math></b>	46 (0,9906)	51 (0,9972)	55 (0,9972)	14 (0,9995)	35 (0,9971)	201	0,9963
<b><math>1/y^2</math></b>	38 (0,9921)	48 (0,9889)	53 (0,9884)	11 (0,9993)	30 (0,9963)	180	0,9930

**Tabela B4** – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a anfetamina.

Ponderação ( $w_i$ )	ER% ( $r^2$ )					$\Sigma ER\%$	$r^2$ (média)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>1</b>	227 (0,9973)	187 (0,9980)	435 (0,9946)	341 (0,9974)	94 (0,9994)	1283	0,9973
<b><math>1/\sqrt{x}</math></b>	72 (0,9969)	121 (0,9976)	64 (0,9940)	75 (0,9970)	73 (0,9992)	405	0,9970
<b><math>1/x</math></b>	72 (0,9960)	102 (0,9963)	54 (0,9926)	78 (0,9960)	62 (0,9987)	368	0,9959
<b><math>1/x^2</math></b>	56 (0,9919)	63 (0,9894)	49 (0,9920)	72 (0,9854)	51 (0,9933)	291	0,9904
<b><math>1/\sqrt{y}</math></b>	70 (0,9968)	118 (0,9976)	72 (0,9936)	79 (0,9969)	72 (0,9992)	410	0,9968
<b><math>1/y</math></b>	75 (0,9957)	105 (0,9964)	56 (0,9919)	77 (0,9959)	61 (0,9988)	374	0,9957
<b><math>1/y^2</math></b>	61 (0,9917)	67 (0,9896)	53 (0,9912)	77 (0,9863)	51 (0,9943)	309	0,9906

Onde ER% é o erro relativo percentual correspondente a todos os calibradores da curva para um determinado  $w_i$ .



Tabela B5 – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para o MDA.

Ponderação ( $w_i$ )	ER% ( $r^2$ )					$\Sigma ER\%$	$r^2$ (média)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
1	701 (0,9973)	335 (0,9982)	952 (0,9988)	85 (0,9990)	903 (0,9988)	2976	0,9984
$1/\sqrt{x}$	290 (0,9952)	190 (0,9972)	338 (0,9971)	86 (0,9988)	311 (0,9971)	1216	0,9971
$1/x$	141 (0,9903)	114 (0,9946)	138 (0,9933)	68 (0,9982)	131 (0,9938)	593	0,9940
$1/x^2$	77 (0,9842)	80 (0,9853)	84 (0,9847)	43 (0,9949)	80 (0,9869)	363	0,9872
$1/\sqrt{y}$	328 (0,9955)	199 (0,9973)	365 (0,9973)	90 (0,9988)	346 (0,9974)	1327	0,9973
$1/y$	169 (0,9919)	119 (0,9951)	154 (0,9944)	78 (0,9982)	152 (0,9948)	673	0,9949
$1/y^2$	88 (0,9837)	86 (0,9866)	90 (0,9857)	48 (0,9952)	87 (0,9879)	399	0,9878

Tabela B6 – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a metanfetamina.

Ponderação ( $w_i$ )	ER% ( $r^2$ )					$\Sigma ER\%$	$r^2$ (média)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
1	590 (0,9987)	158 (0,9999)	88 (0,9998)	92 (0,9978)	126 (0,9999)	1054	0,9992
$1/\sqrt{x}$	249 (0,9976)	108 (0,9997)	91 (0,9996)	100 (0,9975)	58 (0,9999)	606	0,9989
$1/x$	138 (0,9950)	62 (0,9990)	66 (0,9990)	78 (0,9964)	32 (0,9996)	376	0,9978
$1/x^2$	82 (0,9860)	44 (0,9938)	49 (0,9934)	58 (0,9906)	25 (0,9984)	258	0,9924
$1/\sqrt{y}$	252 (0,9978)	107 (0,9997)	90 (0,9996)	100 (0,9974)	59 (0,9999)	607	0,9989
$1/y$	140 (0,9956)	62 (0,9991)	66 (0,9991)	82 (0,9963)	33 (0,9996)	382	0,9979
$1/y^2$	85 (0,9862)	45 (0,9947)	48 (0,9944)	63 (0,9908)	24 (0,9985)	266	0,9929

Onde ER% é o erro relativo percentual correspondente a todos os calibradores da curva para um determinado  $w_i$ .

Tabela B7 – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para o MDMA.

Ponderação ( $w_i$ )	ER% ( $r^2$ )					$\Sigma ER\%$	$r^2$ (média)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
1	528 (0,9992)	185 (0,9983)	96 (1,0000)	141 (0,9997)	323 (0,9986)	1274	0,9992
$1/\sqrt{x}$	137 (0,9987)	177 (0,9973)	57 (0,9999)	94 (0,9995)	93 (0,9983)	559	0,9988
$1/x$	51 (0,9980)	152 (0,9936)	38 (0,9998)	60 (0,9991)	55 (0,9974)	356	0,9976
$1/x^2$	39 (0,9966)	122 (0,9457)	30 (0,9968)	41 (0,9945)	54 (0,9928)	287	0,9853
$1/\sqrt{y}$	145 (0,9987)	159 (0,9973)	56 (1,0000)	96 (0,9995)	98 (0,9983)	555	0,9988
$1/y$	74 (0,9979)	136 (0,9944)	37 (0,9998)	62 (0,9991)	58 (0,9974)	366	0,9977
$1/y^2$	41 (0,9965)	121 (0,9668)	29 (0,9973)	42 (0,9955)	54 (0,9933)	287	0,9899

Tabela B8 – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a benzoilecgonina.

Ponderação ( $w_i$ )	ER% ( $r^2$ )					$\Sigma ER\%$	$r^2$ (média)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
1	360 (0,9986)	241 (0,9991)	88 (0,9991)	144 (0,9973)	787 (0,9957)	1620	0,9980
$1/\sqrt{x}$	78 (0,9983)	91 (0,9985)	124 (0,9983)	128 (0,9964)	185 (0,9950)	606	0,9973
$1/x$	82 (0,9977)	66 (0,9971)	104 (0,9957)	128 (0,9939)	84 (0,9932)	464	0,9955
$1/x^2$	74 (0,9874)	70 (0,9883)	84 (0,9793)	120 (0,9670)	73 (0,9819)	421	0,9808
$1/\sqrt{y}$	77 (0,9983)	101 (0,9984)	113 (0,9983)	122 (0,9965)	180 (0,9950)	594	0,9973
$1/y$	82 (0,9977)	65 (0,9968)	100 (0,9962)	123 (0,9941)	78 (0,9931)	447	0,9956
$1/y^2$	72 (0,9891)	73 (0,9890)	78 (0,9834)	119 (0,9731)	80 (0,9774)	422	0,9824

Onde ER% é o erro relativo percentual correspondente a todos os calibradores da curva para um determinado  $w_i$ .

Tabela B9 – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a cocaína.

Ponderação ( $w_i$ )	ER% ( $r^2$ )					$\Sigma ER\%$	$r^2$ (média)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
1	496 (0,9996)	241 (0,9991)	88 (0,9991)	481 (0,9995)	295 (0,9995)	1600	0,9994
$1/\sqrt{x}$	216 (0,9988)	91 (0,9985)	124 (0,9983)	170 (0,9988)	151 (0,9991)	752	0,9987
$1/x$	97 (0,9963)	66 (0,9971)	104 (0,9957)	75 (0,9970)	75 (0,9979)	418	0,9968
$1/x^2$	81 (0,9843)	70 (0,9883)	84 (0,9793)	55 (0,9920)	48 (0,9938)	338	0,9876
$1/\sqrt{y}$	222 (0,9986)	101 (0,9984)	113 (0,9983)	171 (0,9986)	157 (0,9991)	765	0,9986
$1/y$	102 (0,9955)	65 (0,9968)	100 (0,9962)	74 (0,9964)	79 (0,9977)	420	0,9965
$1/y^2$	88 (0,9820)	73 (0,9890)	78 (0,9834)	57 (0,9911)	49 (0,9934)	346	0,9878

Tabela B10 – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para o EDDP.

Ponderação ( $w_i$ )	ER% ( $r^2$ )					$\Sigma ER\%$	$r^2$ (média)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
1	679 (0,9956)	1044 (0,9975)	385 (0,9990)	299 (0,9994)	527 (0,9987)	2934	0,9980
$1/\sqrt{x}$	128 (0,9951)	327 (0,9956)	101 (0,9984)	97 (0,9990)	117 (0,9983)	770	0,9973
$1/x$	77 (0,9944)	124 (0,9923)	60 (0,9973)	79 (0,9981)	52 (0,9978)	392	0,9960
$1/x^2$	75 (0,9816)	65 (0,9858)	58 (0,9932)	78 (0,9824)	49 (0,9941)	325	0,9874
$1/\sqrt{y}$	139 (0,9948)	346 (0,9954)	103 (0,9983)	101 (0,9990)	118 (0,9983)	807	0,9971
$1/y$	82 (0,9939)	130 (0,9913)	59 (0,9970)	83 (0,9980)	53 (0,9978)	408	0,9956
$1/y^2$	87 (0,9807)	68 (0,9840)	60 (0,9928)	87 (0,9805)	49 (0,9943)	352	0,9865

Onde ER% é o erro relativo percentual correspondente a todos os calibradores da curva para um determinado  $w_i$ .

**Tabela B11** – Estudo da linearidade utilizando diferentes fatores de ponderação para a metadona.

Ponderação ( $w_i$ )	ER% ( $r^2$ )					$\Sigma ER\%$	$r^2$ (média)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>1</b>	248 (0,9994)	108 (0,9993)	738 (0,9983)	51 (0,9997)	166 (0,9994)	1311	0,9992
<b><math>1/\sqrt{x}</math></b>	100 (0,9991)	108 (0,9991)	201 (0,9974)	77 (0,9995)	134 (0,9989)	619	0,9988
<b><math>1/x</math></b>	63 (0,9983)	72 (0,9982)	88 (0,9957)	61 (0,9989)	91 (0,9973)	376	0,9977
<b><math>1/x^2</math></b>	50 (0,9944)	53 (0,9942)	66 (0,9884)	45 (0,9950)	63 (0,9890)	277	0,9922
<b><math>1/\sqrt{y}</math></b>	102 (0,9991)	107 (0,9991)	197 (0,9975)	76 (0,9995)	130 (0,9989)	612	0,9988
<b><math>1/y</math></b>	73 (0,9984)	72 (0,9983)	86 (0,9961)	63 (0,9990)	90 (0,9975)	384	0,9979
<b><math>1/y^2</math></b>	52 (0,9950)	55 (0,9942)	64 (0,9896)	45 (0,9953)	63 (0,9903)	279	0,9929

Onde  $ER\%$  é o erro relativo percentual correspondente a todos os calibradores da curva para um determinado  $w_i$ .

## 8.3. ANEXO C – RESULTADOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DA REPETIBILIDADE

Tabela C1 – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a morfina.

Conc. (ng/mL)	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Area	Area PI	A/A PI
20 ng/mL	0,83	0,83	1,000	993	51345	0,0193
	0,83	0,83	1,000	1052	51195	0,0205
	0,83	0,83	1,000	1098	51644	0,0213
	0,83	0,83	1,000	1083	50429	0,0215
	0,83	0,83	1,000	1109	51813	0,0214
	<b>Media</b>		<b>1,000</b>	<b>Media</b>		<b>0,0208</b>
	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,000</b>	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,001</b>
400 ng/mL	<b>CV (%)</b>		<b>0,00%</b>	<b>CV (%)</b>		<b>4,3%</b>
	0,83	0,83	1,000	18289	45352	0,4033
	0,83	0,83	1,000	17835	51365	0,3472
	0,83	0,83	1,000	19179	54265	0,3534
	0,83	0,83	1,000	18430	55102	0,3345
	0,83	0,83	1,000	18479	49328	0,3746
	<b>Media</b>		<b>1,000</b>	<b>Media</b>		<b>0,3626</b>
	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,000</b>	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,027</b>
	<b>CV (%)</b>		<b>0,00%</b>	<b>CV (%)</b>		<b>7,4%</b>

Tabela C2 – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a codeína.

Conc. (ng/mL)	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Area	Area PI	A/A PI
20 ng/mL	1,23	1,22	1,008	5879	82166	0,0716
	1,23	1,22	1,008	5895	83574	0,0705
	1,23	1,22	1,008	6306	89154	0,0707
	1,23	1,23	1,000	5732	82156	0,0698
	1,23	1,22	1,008	5790	76232	0,0760
	<b>Media</b>		<b>1,007</b>	<b>Media</b>		<b>0,0717</b>
	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,004</b>	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,002</b>
400 ng/mL	<b>CV (%)</b>		<b>0,36%</b>	<b>CV (%)</b>		<b>3,4%</b>
	1,23	1,23	1,000	93433	75696	1,2343
	1,23	1,23	1,000	91669	63730	1,4384
	1,23	1,22	1,008	97731	78541	1,2443
	1,23	1,23	1,000	94382	76623	1,2318
	1,23	1,22	1,008	99666	74963	1,3295
	<b>Media</b>		<b>1,003</b>	<b>Media</b>		<b>1,2957</b>
	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,004</b>	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,089</b>
	<b>CV (%)</b>		<b>0,45%</b>	<b>CV (%)</b>		<b>6,9%</b>

Tabela C3 – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a 6-monoacetilmorfina.

Conc. (ng/mL)	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Area	Area PI	A/A PI
20 ng/mL	1,38	1,38	1,000	1133	109382	0,0104
	1,38	1,38	1,000	1376	113743	0,0121
	1,38	1,38	1,000	1160	115567	0,0100
	1,38	1,38	1,000	1143	107675	0,0106
	1,38	1,38	1,000	1200	103286	0,0116
	<b>Media</b>		<b>1,000</b>	<b>Media</b>		<b>0,0109</b>
	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,000</b>	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,001</b>
	<b>CV (%)</b>		<b>0,00%</b>	<b>CV (%)</b>		<b>8,0%</b>
	1,38	1,38	1,000	24760	108341	0,2285
	1,38	1,38	1,000	29582	104340	0,2835
400 ng/mL	1,38	1,38	1,000	30808	109335	0,2818
	1,38	1,38	1,000	25117	93840	0,2677
	1,38	1,37	1,007	26805	96755	0,2770
	<b>Media</b>		<b>1,001</b>	<b>Media</b>		<b>0,2677</b>
	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,003</b>	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,023</b>
	<b>CV (%)</b>		<b>0,33%</b>	<b>CV (%)</b>		<b>8,5%</b>

Tabela C4 – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a anfetamina.

Conc. (ng/mL)	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Area	Area PI	A/A PI
20 ng/mL	1,41	1,4	1,007	20513	241331	0,0850
	1,41	1,4	1,007	23908	241874	0,0988
	1,41	1,4	1,007	24631	278124	0,0886
	1,41	1,4	1,007	21914	255074	0,0859
	1,41	1,4	1,007	24507	210533	0,1164
	<b>Media</b>		<b>1,007</b>	<b>Media</b>		<b>0,0949</b>
	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,000</b>	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,013</b>
	<b>CV (%)</b>		<b>0,00%</b>	<b>CV (%)</b>		<b>14%</b>
	1,40	1,40	1,000	367425	216166	1,6997
	1,41	1,40	1,007	350478	182770	1,9176
400 ng/mL	1,41	1,40	1,007	338794	230839	1,4677
	1,41	1,40	1,007	342444	213225	1,6060
	1,41	1,40	1,007	378409	218124	1,7348
	<b>Media</b>		<b>1,006</b>	<b>Media</b>		<b>1,6852</b>
	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,003</b>	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,166</b>
	<b>CV (%)</b>		<b>0,32%</b>	<b>CV (%)</b>		<b>9,9%</b>

Tabela C5 – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para o MDA.

Conc. (ng/mL)	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Area	Area PI	A/A PI
20 ng/mL	1,44	1,53	0,941	56816	117402	0,4839
	1,44	1,53	0,941	54336	95158	0,5710
	1,44	1,53	0,941	55436	105243	0,5267
	1,45	1,53	0,948	47981	84017	0,5711
	1,44	1,53	0,941	59840	95357	0,6275
	<b>Media</b>		<b>0,942</b>	<b>Media</b>		<b>0,5561</b>
	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,003</b>	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,054</b>
	<b>CV (%)</b>		<b>0,31%</b>	<b>CV (%)</b>		<b>9,7%</b>
	1,44	1,53	0,941	826944	84609	9,7738
	1,45	1,53	0,948	783746	77774	10,0772
400 ng/mL	1,45	1,53	0,948	648647	85821	7,5581
	1,45	1,53	0,948	770893	88048	8,7554
	1,44	1,53	0,941	835869	80516	10,3814
	<b>Media</b>		<b>0,945</b>	<b>Media</b>		<b>9,3092</b>
	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,004</b>	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>1,154</b>
	<b>CV (%)</b>		<b>0,38%</b>	<b>CV (%)</b>		<b>12%</b>

Tabela C6 – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a metanfetamina..

Conc. (ng/mL)	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Area	Area PI	A/A PI
20 ng/mL	1,51	1,5	1,007	62167	353780	0,1757
	1,51	1,5	1,007	75577	336341	0,2247
	1,51	1,5	1,007	79718	435820	0,1829
	1,51	1,5	1,007	73041	366634	0,1992
	1,51	1,5	1,007	78353	349242	0,2244
	<b>Media</b>		<b>1,007</b>	<b>Media</b>		<b>0,2014</b>
	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,000</b>	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,023</b>
	<b>CV (%)</b>		<b>0,00%</b>	<b>CV (%)</b>		<b>11%</b>
	1,51	1,50	1,007	1043531	331760	3,1454
	1,51	1,50	1,007	1237879	284995	4,3435
400 ng/mL	1,51	1,50	1,007	1302233	371235	3,5078
	1,51	1,50	1,007	1159717	340696	3,4040
	1,51	1,50	1,007	1218285	356221	3,4200
	<b>Media</b>		<b>1,007</b>	<b>Media</b>		<b>3,5642</b>
	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,000</b>	<b>Desv. Pad. (s)</b>		<b>0,456</b>
	<b>CV (%)</b>		<b>0,00%</b>	<b>CV (%)</b>		<b>13%</b>

Tabela C7 – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para o MDMA.

Conc. (ng/mL)	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Area	Area PI	A/A PI
20 ng/mL	1,53	1,53	1,000	72506	117402	0,6176
	1,53	1,53	1,000	67444	95158	0,7088
	1,53	1,53	1,000	69350	105243	0,6590
	1,53	1,53	1,000	62997	84017	0,7498
	1,53	1,53	1,000	69254	95357	0,7263
		<b>Media</b>	<b>1,000</b>		<b>Media</b>	<b>0,6923</b>
		<b>Desv. Pad. (s)</b>	<b>0,000</b>		<b>Desv. Pad. (s)</b>	<b>0,053</b>
		<b>CV (%)</b>	<b>0,00%</b>		<b>CV (%)</b>	<b>7,7%</b>
	1,53	1,53	1,000	1103554	84609	13,0430
	1,53	1,53	1,000	1068870	77774	13,7432
400 ng/mL	1,53	1,53	1,000	1053807	85821	12,2791
	1,53	1,53	1,000	1020931	88048	11,5952
	1,53	1,53	1,000	970398	80516	12,0523
		<b>Media</b>	<b>1,000</b>		<b>Media</b>	<b>12,5426</b>
		<b>Desv. Pad. (s)</b>	<b>0,000</b>		<b>Desv. Pad. (s)</b>	<b>0,851</b>
		<b>CV (%)</b>	<b>0,00%</b>		<b>CV (%)</b>	<b>6,8%</b>

Tabela C8 – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a benzoilecgonina.

Conc. (ng/mL)	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Area	Area PI	A/A PI
20 ng/mL	1,6	1,6	1,000	70166	92467	0,7588
	1,6	1,6	1,000	88131	92386	0,9539
	1,6	1,6	1,000	76612	84630	0,9053
	1,6	1,6	1,000	74164	110800	0,6693
	1,6	1,6	1,000	77295	91281	0,8468
		<b>Media</b>	<b>1,000</b>		<b>Media</b>	<b>0,8268</b>
		<b>Desv. Pad. (s)</b>	<b>0,000</b>		<b>Desv. Pad. (s)</b>	<b>0,114</b>
		<b>CV (%)</b>	<b>0,00%</b>		<b>CV (%)</b>	<b>14%</b>
	1,60	1,60	1,000	1211927	89251	13,5788
	1,60	1,60	1,000	1431067	78980	18,1193
400 ng/mL	1,61	1,60	1,006	1115751	89842	12,4191
	1,60	1,60	1,000	1180195	75781	15,5737
	1,60	1,61	0,994	1178930	75914	15,5299
		<b>Media</b>	<b>1,000</b>		<b>Media</b>	<b>15,0441</b>
		<b>Desv. Pad. (s)</b>	<b>0,004</b>		<b>Desv. Pad. (s)</b>	<b>2,180</b>
		<b>CV (%)</b>	<b>0,44%</b>		<b>CV (%)</b>	<b>14%</b>



Tabela C9 – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a cocaína.

Conc. (ng/mL)	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Area	Area PI	A/A PI
20 ng/mL	2,05	2,05	1,000	94600	162528	0,5821
	2,05	2,05	1,000	93961	166946	0,5628
	2,05	2,05	1,000	110431	185298	0,5960
	2,05	2,05	1,000	108063	186261	0,5802
	2,05	2,05	1,000	97049	179888	0,5395
	Media		1,000	Media		0,5721
	Desv. Pad. (s)		0,000	Desv. Pad. (s)		0,022
	CV (%)		0,00%	CV (%)		3,8%
	2,05	2,05	1,000	1783443	166927	10,6840
	2,05	2,05	1,000	1701725	162935	10,4442
400 ng/mL	2,05	2,05	1,000	1818897	150668	12,0722
	2,05	2,05	1,000	1798868	173728	10,3545
	2,05	2,05	1,000	1818848	174860	10,4017
	Media		1,000	Media		10,7913
	Desv. Pad. (s)		0,000	Desv. Pad. (s)		0,727
	CV (%)		0,00%	CV (%)		6,7%

Tabela C10 – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para o EDDP.

Conc. (ng/mL)	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Area	Area PI	A/A PI
20 ng/mL	2,8	2,8	1,000	25748	20403	1,2620
	2,81	2,8	1,004	28248	23033	1,2264
	2,8	2,8	1,000	27747	26768	1,0366
	2,81	2,8	1,004	25373	23023	1,1021
	2,81	2,8	1,004	25699	24317	1,0568
	Media		1,002	Media		1,1368
	Desv. Pad. (s)		0,002	Desv. Pad. (s)		0,102
	CV (%)		0,20%	CV (%)		8,9%
	2,80	2,80	1,000	555685	26585	20,9020
	2,81	2,80	1,004	514348	19631	26,2002
400 ng/mL	2,81	2,80	1,004	570530	25763	22,1456
	2,81	2,81	1,000	525277	27392	19,1761
	2,81	2,80	1,004	545445	26451	20,6210
	Media		1,002	Media		21,8090
	Desv. Pad. (s)		0,002	Desv. Pad. (s)		2,672
	CV (%)		0,20%	CV (%)		12%

*Tabela C11 – Estudo da repetibilidade (precisão intra-ensaio) para a metadona.*

Conc. (ng/mL)	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Area	Area PI	A/A PI
20 ng/mL	3,03	3,02	1,003	127313	233217	0,5459
	3,03	3,02	1,003	144304	222323	0,6491
	3,03	3,02	1,003	176679	259326	0,6813
	3,03	3,03	1,000	154950	239089	0,6481
	3,03	3,02	1,003	148100	231291	0,6403
		<b>Media</b>	<b>1,003</b>		<b>Media</b>	<b>0,6329</b>
		<b>Desv. Pad. (s)</b>	<b>0,001</b>		<b>Desv. Pad. (s)</b>	<b>0,051</b>
		<b>CV (%)</b>	<b>0,15%</b>		<b>CV (%)</b>	<b>8,1%</b>
	3,03	3,02	1,003	2374189	220491	10,7677
	3,03	3,02	1,003	2498837	222233	11,2442
400 ng/mL	3,03	3,02	1,003	2689811	241874	11,1207
	3,02	3,02	1,000	2407663	222258	10,8327
	3,03	3,02	1,003	2732619	224726	12,1598
		<b>Media</b>	<b>1,003</b>		<b>Media</b>	<b>11,2250</b>
		<b>Desv. Pad. (s)</b>	<b>0,001</b>		<b>Desv. Pad. (s)</b>	<b>0,559</b>
		<b>CV (%)</b>	<b>0,15%</b>		<b>CV (%)</b>	<b>5,0%</b>

## 8.4. ANEXO D – RESULTADOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DA PRECISÃO INTERMÉDIA

Tabela D1 – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a morfina.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>Coef. Correl. (r2)</b>	0,9996	0,9924	0,9990	0,9943	0,9987		
<b>Declive (b)</b>	0,2736	0,4215	0,4495	0,4574	0,4409		
<b>Ordenada (a)</b>	-0,0050	0,0664	0,0398	-0,0571	0,0004		
<b>Conc. 20 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>19,6</b>
<b>Replic. 1</b>	21,1	18,2	19,8	17,9	21,2	<b>Recup. média (R)</b>	<b>98,2</b>
<b>Replic. 2</b>	19,2	18,5	19,6	19,9	19,0	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>0,94</b>
<b>Replic. 3</b>	21,0	18,5	21,2	19,4	20,1	<b>Betw.Run (Srun)</b>	<b>0,68</b>
<b>Média</b>	20,4	18,4	20,2	19,1	20,1	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>1,16</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	102,1	91,9	101,0	95,5	100,5	<b>C.V.</b>	<b>5,9%</b>
<b>Conc. 400 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>387,2</b>
<b>Replic. 1</b>	369,3	431,4	402,4	403,7	411,3	<b>Recup. média (R)</b>	<b>96,8</b>
<b>Replic. 2</b>	385,5	389,6	392,3	346,6	392,7	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>20,24</b>
<b>Replic. 3</b>	365,6	376,0	388,8	372,3	380,9	<b>Betw.Run (Srun)</b>	<b>3,99</b>
<b>Média</b>	373,5	399,0	394,5	374,2	395,0	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>20,63</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	93,4	99,7	98,6	93,5	98,7	<b>C.V.</b>	<b>5,3%</b>

## SUMÁRIO (20 ng/mL)

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	61,23	20,41	1,1923
Coluna 2	3	55,13	18,376667	0,0209333
Coluna 3	3	60,58	20,193333	0,8074333
Coluna 4	3	57,27	19,09	1,0717
Coluna 5	3	60,3	20,1	1,3111

## ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	9,0270267	4	2,2567567	2,5624773	0,1036965	3,4780497
Dentro de grupos	8,8069333	10	0,8806933			
Total	17,83396	14				

## SUMÁRIO (400 ng/mL)

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	1120,41	373,47	112,4551
Coluna 2	3	1196,98	398,99333	831,65963
Coluna 3	3	1183,39	394,46333	49,782533
Coluna 4	3	1122,56	374,18667	819,17203
Coluna 5	3	1184,9	394,96667	236,22943

## ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1830,0549	4	457,51372	1,116269	0,4016159	3,4780497
Dentro de grupos	4098,5975	10	409,85975			
Total	5928,6524	14				

Tabela D2 – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a codeína.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>Coef. Correl. (r2)</b>	0,9971	0,9940	0,9996	0,9994	0,9975		
<b>Declive (b)</b>	0,9311	1,0291	1,1056	0,9491	0,9633		
<b>Ordenada (a)</b>	0,0437	-0,0546	0,1422	0,2303	0,0088		
<b>Conc. 20 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>19,9</b>
<b>Replic. 1</b>	18,2	19,4	19,4	19,5	19,8	<b>Recup. média (R)</b>	<b>99,4</b>
<b>Replic. 2</b>	19,7	20,5	20,7	20,4	19,3	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>0,91</b>
<b>Replic. 3</b>	19,4	19,2	19,9	22,2	20,9	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>0,23</b>
<b>Média</b>	19,1	19,7	20,0	20,7	20,0	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>0,94</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	95,4	98,5	100,0	103,4	99,9	<b>C.V.</b>	<b>4,7%</b>
<b>Conc. 400 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>388,7</b>
<b>Replic. 1</b>	359,0	448,5	414,4	414,8	407,2	<b>Recup. média (R)</b>	<b>97,2</b>
<b>Replic. 2</b>	374,7	387,9	372,5	375,2	396,4	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>24,29</b>
<b>Replic. 3</b>	360,4	373,1	362,2	398,3	385,5	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>6,02</b>
<b>Média</b>	364,7	403,2	383,0	396,1	396,4	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>25,02</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	91,2	100,8	95,7	99,0	99,1	<b>C.V.</b>	<b>6,4%</b>

Anova: factor único

**SUMÁRIO (20 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	57,25	19,083333	0,6210333
Coluna 2	3	59,1	19,7	0,5031
Coluna 3	3	60	20	0,4591
Coluna 4	3	62,01	20,67	1,8732
Coluna 5	3	59,91	19,97	0,6493

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	3,9407067	4	0,9851767	1,1997573	0,3692897	3,4780497
Dentro de grupos	8,2114667	10	0,8211467			
Total	12,152173	14				

**SUMÁRIO (400 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	1094,1	364,7	75,8332
Coluna 2	3	1209,47	403,15667	1596,9956
Coluna 3	3	1148,99	382,99667	763,59053
Coluna 4	3	1188,35	396,11667	395,51763
Coluna 5	3	1189,11	396,37	117,2901

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	2794,0618	4	698,51546	1,1842348	0,3750871	3,4780497
Dentro de grupos	5898,4542	10	589,84542			
Total	8692,516	14				

Tabela D3 – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a 6-monoacetilmorfina.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>Coef. Correl. (r2)</b>	0,9915	0,9922	0,9960	0,9984	0,9961		
<b>Declive (b)</b>	0,1989	0,1265	0,3508	0,3625	0,3169		
<b>Ordenada (a)</b>	-0,0746	-0,0529	-0,0305	0,2703	0,1573		
<b>Conc. 20 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>18,7</b>
<b>Replic. 1</b>	20,9	14,9	20,0	21,5	16,5	<b>Recup. média (R)</b>	<b>93,5</b>
<b>Replic. 2</b>	19,9	15,9	17,0	19,1	18,2	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>1,26</b>
<b>Replic. 3</b>	20,9	16,5	18,0	21,7	19,6	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>1,91</b>
<b>Média</b>	20,6	15,8	18,4	20,8	18,1	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>2,28</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	102,8	78,9	91,8	103,8	90,5	<b>C.V.</b>	<b>12,2%</b>
<b>Conc. 400 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>406,8</b>
<b>Replic. 1</b>	456,5	377,6	435,1	438,1	397,7	<b>Recup. média (R)</b>	<b>101,7</b>
<b>Replic. 2</b>	400,2	287,4	425,4	409,9	398,3	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>32,17</b>
<b>Replic. 3</b>	431,9	406,1	444,9	422,3	370,8	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>27,44</b>
<b>Média</b>	429,5	357,0	435,1	423,4	388,9	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>42,28</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	107,4	89,3	108,8	105,9	97,2	<b>C.V.</b>	<b>10,4%</b>

Anova: factor único

**SUMÁRIO (20 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	61,67	20,556667	0,3745333
Coluna 2	3	47,35	15,783333	0,6550333
Coluna 3	3	55,07	18,356667	2,3001333
Coluna 4	3	62,25	20,75	2,1204
Coluna 5	3	54,29	18,096667	2,4886333

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	49,914507	4	12,478627	7,859331	0,0039236	3,4780497
Dentro de grupos	15,877467	10	1,5877467			
Total	65,791973	14				

**SUMÁRIO (400 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	1288,58	429,52667	795,34763
Coluna 2	3	1071,08	357,02667	3837,8286
Coluna 3	3	1305,32	435,10667	95,162433
Coluna 4	3	1270,28	423,42667	200,07823
Coluna 5	3	1166,78	388,92667	246,79103

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	13173,167	4	3293,2916	3,1817964	0,0626692	3,4780497
Dentro de grupos	10350,416	10	1035,0416			
Total	23523,582	14				

Tabela D4 – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a anfetamina.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>Coef. Correl. (r2)</b>	0,9967	0,9961	0,9926	0,9959	0,9987		
<b>Declive (b)</b>	0,1585	0,1498	0,1701	0,1380	0,1335		
<b>Ordenada (a)</b>	0,0579	0,0626	0,0350	0,0221	0,0340		
<b>Conc. 20 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>21,0</b>
<b>Replic. 1</b>	20,5	18,6	19,2	18,9	22,5	<b>Recup. média (R)</b>	<b>104,9</b>
<b>Replic. 2</b>	20,0	18,8	22,7	21,3	21,1	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>1,52</b>
<b>Replic. 3</b>	21,6	21,6	23,1	21,1	23,7	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>0,63</b>
<b>Média</b>	20,7	19,7	21,7	20,4	22,4	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>1,64</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	103,6	98,4	108,4	102,1	112,2	<b>C.V.</b>	<b>7,8%</b>
<b>Conc. 400 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>376,6</b>
<b>Replic. 1</b>	412,5	471,9	371,5	378,9	378,5	<b>Recup. média (R)</b>	<b>94,1</b>
<b>Replic. 2</b>	419,2	360,5	359,8	353,2	348,5	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>31,85</b>
<b>Replic. 3</b>	373,8	372,0	340,3	355,9	351,9	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>13,82</b>
<b>Média</b>	401,9	401,5	357,2	362,7	359,7	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>34,72</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	100,5	100,4	89,3	90,7	89,9	<b>C.V.</b>	<b>9,2%</b>

Anova: factor único

**SUMÁRIO (20 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	62,16	20,72	0,6541
Coluna 2	3	59,03	19,676667	2,8697333
Coluna 3	3	65,02	21,673333	4,5374333
Coluna 4	3	61,27	20,423333	1,7240333
Coluna 5	3	67,31	22,436667	1,7169333

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	14,035693	4	3,5089233	1,5253226	0,2674816	3,4780497
Dentro de grupos	23,004467	10	2,3004467			
Total	37,04016	14				

**SUMÁRIO (400 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	1205,62	401,87333	600,62333
Coluna 2	3	1204,43	401,47667	3753,5884
Coluna 3	3	1071,56	357,18667	249,14583
Coluna 4	3	1087,98	362,66	198,5724
Coluna 5	3	1078,95	359,65	270,2649

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	6348,2665	4	1587,0666	1,5644772	0,2574774	3,4780497
Dentro de grupos	10144,39	10	1014,439			
Total	16492,656	14				

Tabela D5 – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para o MDA.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>Coef. Correl. (r2)</b>	0,9935	0,9939	0,9911	0,9971	0,9909		
<b>Declive (b)</b>	0,5533	0,6173	0,7783	0,6328	0,6140		
<b>Ordenada (a)</b>	0,5486	0,4381	0,4673	0,4110	0,4067		
<b>Conc. 20 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>21,6</b>
<b>Replic. 1</b>	23,9	20,6	19,2	19,7	21,2	<b>Recup. média (R)</b>	<b>107,9</b>
<b>Replic. 2</b>	21,6	22,7	21,4	22,2	20,0	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>1,62</b>
<b>Replic. 3</b>	23,6	24,4	19,5	24,5	19,5	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>0,99</b>
<b>Média</b>	23,0	22,5	20,0	22,1	20,2	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>1,90</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	115,0	112,7	100,2	110,6	101,1	<b>C.V.</b>	<b>8,8%</b>
<b>Conc. 400 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>372,3</b>
<b>Replic. 1</b>	419,5	471,5	354,0	355,1	417,3	<b>Recup. média (R)</b>	<b>93,1</b>
<b>Replic. 2</b>	383,9	370,0	341,0	300,2	374,0	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>31,62</b>
<b>Replic. 3</b>	383,6	406,9	334,1	318,8	354,0	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>32,97</b>
<b>Média</b>	395,7	416,2	343,0	324,7	381,8	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>45,68</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	98,9	104,0	85,8	81,2	95,4	<b>C.V.</b>	<b>12,3%</b>

Anova: factor único

**SUMÁRIO (20 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	68,99	22,996667	1,5065333
Coluna 2	3	67,64	22,546667	3,6380333
Coluna 3	3	60,13	20,043333	1,4332333
Coluna 4	3	66,34	22,113333	5,7685333
Coluna 5	3	60,64	20,213333	0,8225333

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	22,36476	4	5,59119	2,122882	0,1524512	3,4780497
Dentro de grupos	26,337733	10	2,6337733			
Total	48,702493	14				

**SUMÁRIO (400 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	1187,03	395,67667	426,39163
Coluna 2	3	1248,46	416,15333	2642,2725
Coluna 3	3	1029,07	343,02333	102,22653
Coluna 4	3	974,14	324,71333	779,37453
Coluna 5	3	1145,26	381,75333	1047,8422

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	17041,669	4	4260,4174	4,2620306	0,0286757	3,4780497
Dentro de grupos	9996,2149	10	999,62149			
Total	27037,884	14				

Tabela D6 – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a metanfetamina.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>Coef. Correl. (r2)</b>	0,9980	0,9987	0,9987	0,9955	0,9994		
<b>Declive (b)</b>	0,3105	0,2987	0,3250	0,2711	0,2683		
<b>Ordenada (a)</b>	0,1370	0,0856	0,1050	0,0970	0,0563		
<b>Conc. 20 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>21,0</b>
<b>Replic. 1</b>	20,4	18,8	20,7	19,0	22,2	<b>Recup. média (R)</b>	<b>104,9</b>
<b>Replic. 2</b>	21,5	20,4	22,0	22,0	20,2	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>1,35</b>
<b>Replic. 3</b>	19,2	19,7	23,1	22,8	22,6	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>0,58</b>
<b>Média</b>	20,4	19,6	22,0	21,2	21,7	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>1,47</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	101,8	98,1	109,8	106,2	108,4	<b>C.V.</b>	<b>7,0%</b>
<b>Conc. 400 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>394,4</b>
<b>Replic. 1</b>	372,9	469,4	391,5	442,7	411,8	<b>Recup. média (R)</b>	<b>98,6</b>
<b>Replic. 2</b>	384,7	403,4	368,0	376,9	368,9	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>27,60</b>
<b>Replic. 3</b>	396,1	411,7	377,8	368,1	371,7	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>11,86</b>
<b>Média</b>	384,6	428,2	379,1	395,9	384,1	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>30,04</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	96,1	107,0	94,8	99,0	96,0	<b>C.V.</b>	<b>7,6%</b>

Anova: factor único

**SUMÁRIO (20 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	61,06	20,353333	1,3052333
Coluna 2	3	58,86	19,62	0,6733
Coluna 3	3	65,89	21,963333	1,4674333
Coluna 4	3	63,73	21,243333	4,0994333
Coluna 5	3	65,04	21,68	1,6041

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	11,30484	4	2,82621	1,5444614	0,2625385	3,4780497
Dentro de grupos	18,299	10	1,8299			
Total	29,60384	14				

**SUMÁRIO (400 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	1153,66	384,55333	135,15903
Coluna 2	3	1284,5	428,16667	1294,9216
Coluna 3	3	1137,31	379,10333	140,25863
Coluna 4	3	1187,65	395,88333	1662,5961
Coluna 5	3	1152,44	384,14667	575,03363

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	4735,3784	4	1183,8446	1,5544304	0,2600041	3,4780497
Dentro de grupos	7615,9381	10	761,59381			
Total	12351,316	14				



Tabela D7 – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para o MDMA.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>Coef. Correl. (r2)</b>	0,9945	0,9965	0,9998	0,9989	0,9974		
<b>Declive (b)</b>	0,8670	0,8468	1,0705	0,8913	0,8999		
<b>Ordenada (a)</b>	0,0847	0,1581	0,1046	0,2882	0,0407		
<b>Conc. 20 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>20,6</b>
<b>Replic. 1</b>	20,5	22,7	20,9	18,4	19,3	<b>Recup. média (R)</b>	<b>102,9</b>
<b>Replic. 2</b>	21,6	22,0	22,1	20,4	18,9	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>1,46</b>
<b>Replic. 3</b>	17,6	23,8	19,2	22,2	19,1	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>1,11</b>
<b>Média</b>	19,9	22,8	20,7	20,3	19,1	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>1,84</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	99,4	114,1	103,7	101,5	95,6	<b>C.V.</b>	<b>8,9%</b>
<b>Conc. 400 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>391,6</b>
<b>Replic. 1</b>	367,0	483,4	393,5	393,0	398,3	<b>Recup. média (R)</b>	<b>97,9</b>
<b>Replic. 2</b>	359,8	391,0	378,3	365,2	398,8	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>26,22</b>
<b>Replic. 3</b>	352,0	465,2	340,4	377,9	410,4	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>31,01</b>
<b>Média</b>	359,6	446,5	370,7	378,7	402,5	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>40,61</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	89,9	111,6	92,7	94,7	100,6	<b>C.V.</b>	<b>10,4%</b>

Anova: factor único

**SUMÁRIO (20 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	59,66	19,886667	4,2930333
Coluna 2	3	68,48	22,826667	0,8082333
Coluna 3	3	62,22	20,74	2,0181
Coluna 4	3	60,9	20,3	3,5769
Coluna 5	3	57,33	19,11	0,0343

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	23,37856	4	5,84464	2,7233604	0,0905909	3,4780497
Dentro de grupos	21,461133	10	2,1461133			
Total	44,839693	14				

**SUMÁRIO (400 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	1078,76	359,58667	56,128133
Coluna 2	3	1339,62	446,54	2393,7391
Coluna 3	3	1112,18	370,72667	745,41803
Coluna 4	3	1136,19	378,73	193,8411
Coluna 5	3	1207,5	402,5	47,3311

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	14290,196	4	3572,549	5,1980114	0,015809	3,4780497
Dentro de grupos	6872,9149	10	687,29149			
Total	21163,111	14				

Tabela D8 – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a benzoilecgonina.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>Coef. Correl. (r2)</b>	0,9976	0,9971	0,9956	0,9958	0,9972		
<b>Declive (b)</b>	1,1105	1,2007	1,1656	1,1752	1,1904		
<b>Ordenada (a)</b>	0,2300	0,0625	0,3198	0,0951	-0,1874		
<b>Conc. 20 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>20,2</b>
<b>Replic. 1</b>	18,4	18,1	24,2	19,0	19,8	<b>Recup. média (R)</b>	<b>100,8</b>
<b>Replic. 2</b>	19,4	18,8	22,3	20,8	17,7	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>1,45</b>
<b>Replic. 3</b>	18,8	16,7	25,2	20,6	22,5	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>2,13</b>
<b>Média</b>	18,9	17,9	23,9	20,1	20,0	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>2,58</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	94,3	89,3	119,5	100,7	100,0	<b>C.V.</b>	<b>12,8%</b>
<b>Conc. 400 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>371,1</b>
<b>Replic. 1</b>	371,4	414,7	414,4	327,2	399,1	<b>Recup. média (R)</b>	<b>92,8</b>
<b>Replic. 2</b>	353,0	370,6	444,9	305,8	383,9	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>22,77</b>
<b>Replic. 3</b>	355,6	373,9	414,3	311,3	326,8	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>37,75</b>
<b>Média</b>	360,0	386,4	424,5	314,7	370,0	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>44,09</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	90,0	96,6	106,1	78,7	92,5	<b>C.V.</b>	<b>11,9%</b>

Anova: factor único

**SUMÁRIO (20 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	56,57	18,856667	0,2560333
Coluna 2	3	53,57	17,856667	1,1857333
Coluna 3	3	71,7	23,9	2,2969
Coluna 4	3	60,39	20,13	1,0587
Coluna 5	3	60,02	20,006667	5,7506333

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	63,0466	4	15,76165	7,4713927	0,004702	3,4780497
Dentro de grupos	21,096	10	2,1096			
Total	84,1426	14				

**SUMÁRIO (400 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	1080,04	360,01333	99,406433
Coluna 2	3	1159,18	386,39333	602,79123
Coluna 3	3	1273,59	424,53	311,2057
Coluna 4	3	944,15	314,71667	123,50333
Coluna 5	3	1109,85	369,95	1454,8492

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	19175,897	4	4793,9743	9,2485066	0,0021536	3,4780497
Dentro de grupos	5183,5118	10	518,35118			
Total	24359,409	14				

Tabela D9 – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a cocaína.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>Coef. Correl. (r2)</b>	0,9962	0,9969	0,9979	0,9990	0,9987		
<b>Declive (b)</b>	1,5350	1,3883	1,2834	0,9526	1,2700		
<b>Ordenada (a)</b>	-0,4735	-0,3577	-0,1482	0,1820	-0,2195		
<b>Conc. 20 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>18,5</b>
<b>Replic. 1</b>	17,1	17,7	17,2	20,6	17,2	<b>Recup. média (R)</b>	<b>92,3</b>
<b>Replic. 2</b>	17,1	18,0	16,7	21,3	17,3	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>1,70</b>
<b>Replic. 3</b>	18,0	18,1	18,0	19,0	23,4	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>0,85</b>
<b>Média</b>	17,4	18,0	17,3	20,3	19,3	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>1,90</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	87,2	89,8	86,4	101,5	96,5	<b>C.V.</b>	<b>10,3%</b>
<b>Conc. 400 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>369,7</b>
<b>Replic. 1</b>	379,5	355,5	335,9	391,7	395,2	<b>Recup. média (R)</b>	<b>92,4</b>
<b>Replic. 2</b>	322,5	345,7	346,5	435,0	398,5	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>24,56</b>
<b>Replic. 3</b>	346,1	371,6	366,2	351,1	405,2	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>19,88</b>
<b>Média</b>	349,4	357,6	349,5	392,6	399,6	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>31,59</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	87,3	89,4	87,4	98,1	99,9	<b>C.V.</b>	<b>8,5%</b>

Anova: factor único

**SUMÁRIO (20 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	52,29	17,43	0,2611
Coluna 2	3	53,85	17,95	0,0523
Coluna 3	3	51,85	17,28333333	0,42903333
Coluna 4	3	60,87	20,29	1,2841
Coluna 5	3	57,89	19,29666667	12,3842333

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	20,2618667	4	5,06546667	1,75752851	0,213896871	3,47804969
Dentro de grupos	28,8215333	10	2,88215333			
Total	49,0834	14				

**SUMÁRIO (400 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	1048,17	349,39	819,7489
Coluna 2	3	1072,82	357,606667	171,325633
Coluna 3	3	1048,56	349,52	237,8649
Coluna 4	3	1177,78	392,593333	1760,45583
Coluna 5	3	1198,83	399,61	25,7083

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	7154,04103	4	1788,51026	2,96591845	0,074322642	3,47804969
Dentro de grupos	6030,20713	10	603,020713			
Total	13184,2482	14				

Tabela D10 – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para o EDDP.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>Coef. Correl. (r2)</b>	0,9946	0,9925	0,9973	0,9998	0,9978		
<b>Declive (b)</b>	1,0619	1,3544	1,3644	1,2185	1,1548		
<b>Ordenada (a)</b>	0,0539	-0,6564	0,2456	-0,0102	-0,0095		
<b>Conc. 20 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>19,3</b>
<b>Replic. 1</b>	18,6	17,9	19,1	19,2	21,6	<b>Recup. média (R)</b>	<b>96,5</b>
<b>Replic. 2</b>	19,7	16,5	19,7	17,2	20,2	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>1,50</b>
<b>Replic. 3</b>	20,2	19,6	22,6	19,5	18,0	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>0,47</b>
<b>Média</b>	19,5	18,0	20,5	18,6	19,9	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>1,57</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	97,5	90,1	102,3	93,1	99,7	<b>C.V.</b>	<b>8,1%</b>
<b>Conc. 400 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>362,9</b>
<b>Replic. 1</b>	367,5	360,8	341,2	357,5	444,5	<b>Recup. média (R)</b>	<b>90,7</b>
<b>Replic. 2</b>	385,9	364,5	318,0	301,8	413,0	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>26,06</b>
<b>Replic. 3</b>	334,4	350,6	380,7	336,9	385,7	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>27,29</b>
<b>Média</b>	362,6	358,6	346,6	332,1	414,4	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>37,73</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	90,7	89,7	86,7	83,0	103,6	<b>C.V.</b>	<b>10,4%</b>

Anova: factor único

**SUMÁRIO (20 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	58,47	19,49	0,7111
Coluna 2	3	54,04	18,013333	2,4745333
Coluna 3	3	61,38	20,46	3,4384
Coluna 4	3	55,86	18,62	1,4673
Coluna 5	3	59,79	19,93	3,1621

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	11,689427	4	2,9223567	1,2984289	0,334592	3,4780497
Dentro de grupos	22,506867	10	2,2506867			
Total	34,196293	14				

**SUMÁRIO (400 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	1087,86	362,62	680,2243
Coluna 2	3	1075,91	358,63667	52,328433
Coluna 3	3	1039,85	346,61667	1004,352
Coluna 4	3	996,24	332,08	791,1108
Coluna 5	3	1243,18	414,39333	866,67743

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	11654,497	4	2913,6243	4,2914401	0,0281142	3,4780497
Dentro de grupos	6789,386	10	678,9386			
Total	18443,883	14				

Tabela D11 – Estudo da precisão intermédia (ou precisão inter-ensaio) para a metadona.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
<b>Coef. Correl. (r2)</b>	0,9982	0,9982	0,9957	0,9988	0,9972		
<b>Declive (b)</b>	0,7548	0,8252	0,9696	0,7870	0,8108		
<b>Ordenada (a)</b>	0,2588	0,2614	0,2061	0,2168	0,2800		
<b>Conc. 20 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>20,6</b>
<b>Replic. 1</b>	20,7	19,4	20,9	20,1	20,5	<b>Recup. média (R)</b>	<b>103,1</b>
<b>Replic. 2</b>	21,3	20,5	21,5	18,5	22,4	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>0,88</b>
<b>Replic. 3</b>	23,2	19,5	20,4	18,9	21,5	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>0,97</b>
<b>Média</b>	21,7	19,8	20,9	19,2	21,4	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>1,31</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	108,7	99,0	104,7	95,8	107,1	<b>C.V.</b>	<b>6,3%</b>
<b>Conc. 400 ng/mL</b>						<b>Conc. Média</b>	<b>391,5</b>
<b>Replic. 1</b>	395,4	432,1	367,5	426,8	365,1	<b>Recup. média (R)</b>	<b>97,9</b>
<b>Replic. 2</b>	422,3	410,8	370,5	372,8	363,1	<b>Repetibil. (Sr)</b>	<b>18,36</b>
<b>Replic. 3</b>	404,6	395,2	397,9	379,4	369,3	<b>Betw. Run (Srun)</b>	<b>16,45</b>
<b>Média</b>	407,4	412,7	378,6	393,0	365,8	<b>Prec. Interm. (Si)</b>	<b>24,65</b>
<b>Recuperação (Ri)</b>	101,9	103,2	94,7	98,2	91,5	<b>C.V.</b>	<b>6,3%</b>

Anova: factor único

**SUMÁRIO (20 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	65,22	21,74	1,5781
Coluna 2	3	59,42	19,806667	0,4014333
Coluna 3	3	62,8	20,933333	0,3385333
Coluna 4	3	57,49	19,163333	0,6808333
Coluna 5	3	64,26	21,42	0,8937

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	14,327093	4	3,5817733	4,6007467	0,0229354	3,4780497
Dentro de grupos	7,7852	10	0,77852			
Total	22,112293	14				

**SUMÁRIO (400 ng/mL)**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	3	1222,33	407,44333	185,76423
Coluna 2	3	1238,12	412,70667	343,34223
Coluna 3	3	1135,92	378,64	279,5499
Coluna 4	3	1178,93	392,97667	867,44813
Coluna 5	3	1097,43	365,81	10,1676

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	4594,343	4	1148,5857	3,4056952	0,0527906	3,4780497
Dentro de grupos	3372,5442	10	337,25442			
Total	7966,8872	14				

## 8.5. ANEXO E – RESULTADOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DA EXATIDÃO

Tabela E1 – Estudo da exatidão para a morfina.

	20 ng/mL		400 ng/mL	
	Conc. média	%Rec.	Conc. média	%Rec.
<b>Dia 1</b>	20,4	102,1	373,5	93,4
<b>Dia 2</b>	18,4	91,9	399,0	99,7
<b>Dia 3</b>	20,2	101,0	394,5	98,6
<b>Dia 4</b>	19,1	95,5	374,2	93,5
<b>Dia 5</b>	20,1	100,5	395,0	98,7
<b>Média</b>		<b>98,2</b>		<b>96,8</b>
<b>Desvio padrão</b>		<b>4,34</b>		<b>3,09</b>
<b>CV(%)</b>		<b>4,4%</b>		<b>3,2%</b>
<b>p</b>		<b>5</b>		<b>5</b>
<b>Texp</b>		<b>0,94</b>		<b>2,31</b>
<b>Incertez. (U<sub>R</sub>)</b>		<b>1,9%</b>		<b>1,4%</b>
<b>Inc. pad. rel. (U<sub>R</sub>)</b>		<b>0,020</b>		<b>0,014</b>

Tabela E2 – Estudo da exatidão para a codeína.

	20 ng/mL		400 ng/mL	
	Conc. média	%Rec.	Conc. média	%Rec.
<b>Dia 1</b>	19,1	95,4	364,7	91,2
<b>Dia 2</b>	19,7	98,5	403,2	100,8
<b>Dia 3</b>	20,0	100,0	383,0	95,7
<b>Dia 4</b>	20,7	103,4	396,1	99,0
<b>Dia 5</b>	20,0	99,9	396,4	99,1
<b>Média</b>		<b>99,4</b>		<b>97,2</b>
<b>Desvio padrão</b>		<b>2,87</b>		<b>3,81</b>
<b>CV(%)</b>		<b>2,9%</b>		<b>3,9%</b>
<b>p</b>		<b>5</b>		<b>5</b>
<b>Texp</b>		<b>0,45</b>		<b>1,66</b>
<b>Incertez. (U<sub>R</sub>)</b>		<b>1,3%</b>		<b>1,7%</b>
<b>Inc. pad. rel. (U<sub>R</sub>)</b>		<b>0,013</b>		<b>0,018</b>

Tabela E3 – Estudo da exatidão para a 6-monoacetilmorfina.

	20 ng/mL		400 ng/mL	
	Conc. média	%Rec.	Conc. média	%Rec.
Dia 1	20,6	102,8	429,5	107,4
Dia 2	15,8	78,9	357,0	89,3
Dia 3	18,4	91,8	435,1	108,8
Dia 4	20,8	103,8	423,4	105,9
Dia 5	18,1	90,5	388,9	97,2
Média		<b>93,5</b>		<b>101,7</b>
Desvio padrão		<b>10,20</b>		<b>8,28</b>
CV(%)		<b>10,9%</b>		<b>8,1%</b>
p		<b>5</b>		<b>5</b>
Texp		<b>1,42</b>		<b>0,46</b>
Incertez. (U <sub>R</sub> )		<b>4,6%</b>		<b>3,7%</b>
Inc. pad. rel. (U <sub>R</sub> )		<b>0,049</b>		<b>0,036</b>

Tabela E4 – Estudo da exatidão para a anfetamina.

	20 ng/mL		400 ng/mL	
	Conc. média	%Rec.	Conc. média	%Rec.
Dia 1	20,7	103,6	401,9	100,5
Dia 2	19,7	98,4	401,5	100,4
Dia 3	21,7	108,4	357,2	89,3
Dia 4	20,4	102,1	362,7	90,7
Dia 5	22,4	112,2	359,7	89,9
Média		<b>104,9</b>		<b>94,1</b>
Desvio padrão		<b>5,41</b>		<b>5,75</b>
CV(%)		<b>5,2%</b>		<b>6,1%</b>
p		<b>5</b>		<b>5</b>
Texp		<b>2,04</b>		<b>2,28</b>
Incertez. (U <sub>R</sub> )		<b>2,4%</b>		<b>2,6%</b>
Inc. pad. rel. (U <sub>R</sub> )		<b>0,023</b>		<b>0,027</b>

Tabela E5 – Estudo da exatidão para o MDA.

	20 ng/mL		400 ng/mL	
	Conc. média	%Rec.	Conc. média	%Rec.
Dia 1	23,0	115,0	395,7	98,9
Dia 2	22,5	112,7	416,2	104,0
Dia 3	20,0	100,2	343,0	85,8
Dia 4	22,1	110,6	324,7	81,2
Dia 5	20,2	101,1	381,8	95,4
Média		<b>107,9</b>		<b>93,1</b>
Desvio padrão		<b>6,83</b>		<b>9,42</b>
CV(%)		<b>6,3%</b>		<b>10,1%</b>
p		<b>5</b>		<b>5</b>
Texp		<b>2,59</b>		<b>1,65</b>
Incertez. (U <sub>R</sub> )		<b>3,1%</b>		<b>4,2%</b>
Inc. pad. rel. (U <sub>R</sub> )		<b>0,028</b>		<b>0,045</b>

Tabela E6 – Estudo da exatidão para a metanfetamina.

	20 ng/mL		400 ng/mL	
	Conc. média	%Rec.	Conc. média	%Rec.
Dia 1	20,4	101,8	384,6	96,1
Dia 2	19,6	98,1	428,2	107,0
Dia 3	22,0	109,8	379,1	94,8
Dia 4	21,2	106,2	395,9	99,0
Dia 5	21,7	108,4	384,1	96,0
Média		<b>104,9</b>		<b>98,6</b>
Desvio padrão		<b>4,85</b>		<b>4,97</b>
CV(%)		<b>4,6%</b>		<b>5,0%</b>
p		<b>5</b>		<b>5</b>
Texp		<b>2,24</b>		<b>0,63</b>
Incertez. (U <sub>R</sub> )		<b>2,2%</b>		<b>2,2%</b>
Inc. pad. rel. (U <sub>R</sub> )		<b>0,021</b>		<b>0,023</b>

Tabela E7 – Estudo da exatidão para o MDMA.

	20 ng/mL		400 ng/mL	
	Conc. média	%Rec.	Conc. média	%Rec.
Dia 1	19,9	99,4	359,6	89,9
Dia 2	22,8	114,1	446,5	111,6
Dia 3	20,7	103,7	370,7	92,7
Dia 4	20,3	101,5	378,7	94,7
Dia 5	19,1	95,6	402,5	100,6
Média		<b>102,9</b>		<b>97,9</b>
Desvio padrão		<b>6,98</b>		<b>8,63</b>
CV(%)		<b>6,8%</b>		<b>8,8%</b>
p		<b>5</b>		<b>5</b>
Texp		<b>0,92</b>		<b>0,54</b>
Incertez. (U <sub>R</sub> )		<b>3,1%</b>		<b>3,9%</b>
Inc. pad. rel. (U <sub>R</sub> )		<b>0,030</b>		<b>0,039</b>

Tabela E8 – Estudo da exatidão para a benzoilecgonina.

	20 ng/mL		400 ng/mL	
	Conc. média	%Rec.	Conc. média	%Rec.
Dia 1	18,9	94,3	360,0	90,0
Dia 2	17,9	89,3	386,4	96,6
Dia 3	23,9	119,5	424,5	106,1
Dia 4	20,1	100,7	314,7	78,7
Dia 5	20,0	100,0	370,0	92,5
Média		<b>100,8</b>		<b>92,8</b>
Desvio padrão		<b>11,46</b>		<b>9,99</b>
CV(%)		<b>11,4%</b>		<b>10,8%</b>
p		<b>5</b>		<b>5</b>
Texp		<b>0,15</b>		<b>1,62</b>
Incertez. (U <sub>R</sub> )		<b>5,1%</b>		<b>4,5%</b>
Inc. pad. rel. (U <sub>R</sub> )		<b>0,051</b>		<b>0,048</b>



Tabela E9 – Estudo da exatidão para a cocaína.

	20 ng/mL		400 ng/mL	
	Conc. média	%Rec.	Conc. média	%Rec.
Dia 1	17,4	87,2	349,4	87,3
Dia 2	18,0	89,8	357,6	89,4
Dia 3	17,3	86,4	349,5	87,4
Dia 4	20,3	101,5	392,6	98,1
Dia 5	19,3	96,5	399,6	99,9
Média		<b>92,3</b>		<b>92,4</b>
Desvio padrão		<b>6,50</b>		<b>6,10</b>
CV(%)		<b>7,0%</b>		<b>6,6%</b>
p		<b>5</b>		<b>5</b>
Texp		<b>2,67</b>		<b>2,77</b>
Incertez. (U <sub>R</sub> )		<b>2,9%</b>		<b>2,7%</b>
Inc. pad. rel. (U <sub>R</sub> )		<b>0,031</b>		<b>0,030</b>

Tabela E10 – Estudo da exatidão para a EDDP.

	20 ng/mL		400 ng/mL	
	Conc. média	%Rec.	Conc. média	%Rec.
Dia 1	19,5	97,5	362,6	90,7
Dia 2	18,0	90,1	358,6	89,7
Dia 3	20,5	102,3	346,6	86,7
Dia 4	18,6	93,1	332,1	83,0
Dia 5	19,9	99,7	414,4	103,6
Média		<b>96,5</b>		<b>90,7</b>
Desvio padrão		<b>4,93</b>		<b>7,79</b>
CV(%)		<b>5,1%</b>		<b>8,6%</b>
p		<b>5</b>		<b>5</b>
Texp		<b>1,58</b>		<b>2,66</b>
Incertez. (U <sub>R</sub> )		<b>2,2%</b>		<b>3,5%</b>
Inc. pad. rel. (U <sub>R</sub> )		<b>0,023</b>		<b>0,038</b>

Tabela E11 – Estudo da exatidão para a metadona.

	20 ng/mL		400 ng/mL	
	Conc. média	%Rec.	Conc. média	%Rec.
Dia 1	21,7	108,7	407,4	101,9
Dia 2	19,8	99,0	412,7	103,2
Dia 3	20,9	104,7	378,6	94,7
Dia 4	19,2	95,8	393,0	98,2
Dia 5	21,4	107,1	365,8	91,5
Média		<b>103,1</b>		<b>97,9</b>
Desvio padrão		<b>5,46</b>		<b>4,89</b>
CV(%)		<b>5,3%</b>		<b>5,0%</b>
p		<b>5</b>		<b>5</b>
Texp		<b>1,25</b>		<b>0,97</b>
Incertez. (U <sub>R</sub> )		<b>2,4%</b>		<b>2,2%</b>
Inc. pad. rel. (U <sub>R</sub> )		<b>0,024</b>		<b>0,022</b>

## 8.6. ANEXO F – RESULTADOS OBTIDOS PARA A ANÁLISE DAS AMOSTRAS REAIS

**Tabela F1** – Resultados obtidos por amostra em relação às substâncias presentes e sua concentração (ng/mL) utilizando as duas metodologias: (A) SPE-GC/MS e (B) DBS-UPLC-MS/MS; e respectiva diferença percentual (Dif%)

Amostra	Substância	A	B	Dif%	Amostra	Substância	A	B	Dif%
1	MDA	11	11	4	15	Morfina	239	273	13
	MDMA	217	205	-6	16	Morfina	228	267	16
2	MDMA	66	72	10	17	Morfina	131	130	-1
3	MDMA	76	72	-6	18	Benzoilecgonina	66	57	-15
4	Anfetamina	22	19	-14		Metadona	76	100	28
	Benzoilecgonina	169	142	-17	19	Codeína	374	354	-5
	MDA	20	33	50		Morfina	195	333	52
	MDMA	346	283	-20	20	Benzoilecgonina	205	170	-19
5	Anfetamina	80	67	-18		Cocaína	24	15	-46
	MDA	26	15	-52	21	EDDP	442	530	18
	MDMA	142	127	-12	22	Morfina	39	24	-48
6	MDMA	326	266	-20	23	Metadona	319	288	-10
7	Benzoilecgonina	575	471	-20	24	Benzoilecgonina	155	127	-20
	Morfina	109	195	57	25	Codeína	137	114	-18
8	Benzoilecgonina	158	138	-13		Morfina	36	40	11
	Cocaína	27	22	-19	26	Morfina	132	234	56
	Morfina	138	161	16	27	MDMA	340	279	-20
9	Benzoilecgonina	364	301	-19	28	Benzoilecgonina	416	345	-19
10	Cocaína	157	106	-38		Morfina	121	112	-8
11	Benzoilecgonina	76	62	-20	29	EDDP	256	248	-3
12	Benzoilecgonina	227	188	-19	30	Morfina	70	49	-36
13	Cocaína	275	231	-17	31	EDDP	49	54	10
14	Benzoilecgonina	67	44	-42		Metadona	260	218	-18

**Tabela F2** – Resultados obtidos por amostra em relação às substâncias presentes e sua concentração (ng/mL) utilizando as duas metodologias: (A) SPE-GC/MS e (B) DBS-UPLC-MS/MS; e respectiva diferença percentual (Dif%) (Continuação)

Amostra	Substância	A	B	Dif%	Amostra	Substância	A	B	Dif%
32	Benzoilecgonina	113	93	-19	50	Anfetamina	55	48	-14
33	Morfina	31	31	-1		Benzoilecgonina	114	105	-8
34	Morfina	97	108	11		Cocaína	30	28	-7
35	Benzoilecgonina	153	132	-15		Codeína	107	124	15
36	Morfina	41	35	-15		MDA	29	41	34
37	Metadona	321	268	-18		MDMA	158	138	-14
38	Morfina	160	130	-20		Metanfetamina	158	138	-14
39	Morfina	48	39	-20		Morfina	40	54	30
40	Morfina	74	51	-37	51	Benzoilecgonina	202	182	-10
41	Benzoilecgonina	162	142	-13	52	Morfina	35	59	51
42	Morfina	22	19	-17	53	Benzoilecgonina	48	44	-8
43	Cocaína	37	22	-49	54	Benzoilecgonina	173	167	-4
	Metadona	40	37	-9	55	Morfina	45	74	49
	Morfina	39	36	-7	56	Morfina	84	75	-12
44	6-MAM	5	6	-14	57	Morfina	62	43	-36
	Codeína	25	29	15	58	Benzoilecgonina	78	79	1
	Morfina	431	508	16	59	Benzoilecgonina	80	74	-8
45	Benzoilecgonina	259	240	-7	60	Benzoilecgonina	393	339	-15
46	Morfina	36	43	18	61	Benzoilecgonina	72	64	-11
47	Morfina	271	269	-1		Morfina	87	53	-48
48	Cocaína	92	80	-14	62	Codeína	151	150	0
	Morfina	123	188	42	63	Codeína	45	39	-15
49	Benzoilecgonina	150	127	-17	64	Morfina	20	17	-13

## 8.7. ANEXO G – TESTE-T PARA DADOS EMPARELHADOS

O teste- $t$  para dados emparelhados é realizado em quatro passos: (1) formular a hipótese; (2) determinar o plano de análise; (3) analisar os dados da amostra; e (4) interpretar os resultados.

- **Formular a hipótese:** o primeiro passo é formular a hipótese nula e uma hipótese alternativa.

Hipótese nula:  $\mu_d = 0$

Hipótese alternativa:  $\mu_d \neq 0$

Estas hipóteses constituem um teste bi-caudal. A hipótese nula será rejeitada se a diferença entre as amostras é muito grande ou muito pequena (for significativamente diferente de zero).

- **Determinar o plano da análise:** para esta análise, o nível de significância selecionado foi de 0,05.
- **Análise dos dados:** utilizando os dados obtidos a partir das duas metodologias, calculou-se o desvio padrão das diferenças ( $s$ ), o erro padrão ( $SE$ ) da diferença média, os graus de liberdade ( $DF$ ), e o teste estatístico do  $t$ -score ( $t$ ) de acordo com as equações seguintes:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (d_i - d)^2}{n - 1}}$$

**Equação G1**

Onde,

$d_i$  – é a diferente entre o par  $i$ ;  $d$  – é a média das diferenças; e  $n$  – é o número de pares de valores.

$$SE = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

**Equação G2**

$$DF = n - 1$$

***Equação G3***

$$t = \frac{(d - D)}{SE}$$

***Equação G4***

*Onde,*

*D – é a diferença média hipotética entre os pares de dados.*

- **Interpretação de resultados:** quando o valor de  $t$  calculado é inferior ao valor de  $t$  tabelado para uma distribuição bi-caudal e um nível de significância de 0,05, a hipótese nula não pode ser rejeitada.